

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ. Ա. ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՔԻՇՄԻՐՅԱՆ ԱՐՍԵՆ ՎԼԱԴԻԿԻ

**MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA ՕՁԻ ԹՈՒՅՆԻ ԴԵՄ ԻՄՈՒՆԱԲԱՆԱԿԱՆ
ՀԱԿԱԹՈՒՅՆԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ**

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

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

ԵՐԵՎԱՆ – 2019

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

КИШМИРЯН АРСЕН ВЛАДИКОВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОТИВОЯДИЯ ПРОТИВ ЗМЕИ MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA**

АВТОРЕФЕРАТ

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

ЕРЕВАН – 2019

Ատենիստության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում:

Գիտական ղեկավար՝

Կենս. գիտ. դոկտոր
Ն.Մ. Այվազյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

բ.գ.դ., պրոֆ. Ա.Վ. Գրիգորյան
կ.գ.թ. Ա.Վ. Ոսկանյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կկայանա 2019 թ. դեկտեմբերի 19-ին ժամը 13⁰⁰– ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, Ֆիզիոլոգիայի 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0028, ք. Երևան, Օրբելի եղբ. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում և <http://www.physiol.sci.am> կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2019 թ. նոյեմբերի 8-ին

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար՝

Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու  Ն. Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА.

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Н.М. Айвазян

Официальные оппоненты

д.м.н., проф. С.В. Григорян
к.б.н. А.В. Восканян

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 19-го декабря 2019г. в 13⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 023 по физиологии, в Институте физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА (0028, Ереван, ул. бр. Орбели, 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. акад. Л.А. Орбели НАН РА и на сайте <http://www.physiol.sci.am>
Автореферат диссертации разослан 8-го ноября 2019 г.

Ученый секретарь специализированного совета
кандидат биологических наук



Н.Э.Татевосян

Թեմայի արդիականությունը: Հանրային առողջապահության կարևորագույն խնդիրներից մեկն է համարվում օձերի խայթոցներով պայմանավորված թունավորումների դեմ պայքարը, որը յուրաքանչյուր տարի մի քանի հարյուր հազար մարդու խեղանդամության և մահվան պատճառ է հանդիսանում: Առողջապահության համաշխարհային կազմակերպության կողմից խայթոցներով պայմանավորված թունավորումները դասակարգվում են անտեսված արևադարձային հիվանդությունների խմբում, որոնց համար առավել խոցելի թիրախ են հանդիսանում Ասիայի, Ենթասահարայի, Լատինական Ամերիկայի, Օվկիանիայի երկրների բնակչությունների անապահով շերտերը:

Օձերի խայթոցների դեմ պայքարի միակ, գիտականորեն ապացուցված թերապիան յուրահատուկ հակաթունային միջոցների ներերակային ներարկումն է, որոնց ստացման ընդհանուր ձևերը մշակվել են մոտ մեկ դար առաջ և մինչ այժմ շատ քիչ փոփոխությունների են ենթարկվել, առավելապես մի շարք տեխնոլոգիական նորամուծություններ են ներդրվել արտադրական գործընթացներում:

Հակաթույները իրենցից ներկայացնում են իմունիզացված կենդանու արյան շիճուկից անջատված իմունոգլոբուլինային արտադրանքներ՝ իմունոգլոբուլինների ամբողջական մոլեկուլներ կամ նրանց Fab, F(ab')₂ հատվածներ:

Հայաստանի բուժհաստատություններում արձանագրված թունավոր օձերի խայթոցները առավելապես բաժին են ընկնում իծերի ընտանիքի ներկայացուցիչ *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) ենթատեսակին: Այսպես ըստ ՀՀ առողջապահության նախարարության պաշտոնական տվյալների (գրություն N ԱՍ/22.1/12646-19) 2015թ-ից մինչև 2019թ-ի հուլիս ամիսը ՀՀ-ում արձանագրվել է օձի խայթոցի ավելի քան 500 դեպք: Չնայած օձերի խայթոցների մեծ տարածվածության հանգամանքին, ՀՀ առողջապահության նախարարությունը չի իրականացնում օձերի թույների դեմ հակաթույների ձեռք բերում և մատակարարում բուժհաստատություններին: Ներկայումս ՀՀ բուժփիմնարկներում հասանելի է միայն ուզբեկական արտադրության (UZBIOPHARM) հակաթույն, որն, ըստ իր մեջ առկա ուղեցույցի, պոլիվալենտ է և նախատեսված է *Vipera lebetina*, *Echis carinatus*, *Naja oxiana* օձերի թույների դեմ: *Vipera lebetina* օձատեսակը իր մեջ ներառում է 5 ենթատեսակ (*M. l. cernovi*, *M. l. lebetina*, *M. l. obtusa*, *M. l. transmediterranea*, *M. l. turanica*), որոնց թունային կազմերը զգալի տարբերվում են: Նկատի ունենալով վերոհիշյալ հանգամանքը և այն, որ Ուզբեկստանում առկա է միայն *M. l. turanica* ենթատեսակը, սույն հակաթույնը իրենից ներկայացնում է բավականին ծանր իմունաբանական ընկալելիություն դրսևորող արտադրանք և կարող է ունենալ նվազ արդյունավետություն, առաջացնելով մի շարք կողմնակի ազդեցություններ MLO ենթատեսակի խայթոցների ժամանակ:

Սույն հանգամանքներից ելնելով, սեփական հակաթույնի արտադրությունը, հակաթույնի ստացման պրոտոկոլների մշակումը և իրագործումը անչափ կարևոր նշանակություն ունի ՀՀ բնակչության առողջապահական խնդիրների լուծման համար:

Ուսումնասիրության նպատակն ու խնդիրները

Ներկայացվող հետազոտության նպատակն է հանդիսացել *Macrovipera lebetina obtusa* օձի թույնի դեմ հակաթույնի ստացումը և արդյունավետության գնահատումը, ինչպես նաև առկա հակաթունային միջոցի՝ UZBIOPHARM-ի հակաթույնի, MLO-ի թույնի նկատմամբ արդյունավետության դիտարկումը:

Ուսումնասիրության նպատակի իրականացման համար դրվել են հետևյալ խնդիրները.

- Ստանալ կենդանական ծագման մոնոկլալենտ յուրահատուկ հակաթույն իժերի *Macrovipera lebetina obtusa* ենթատեսակի թույնի դեմ:
- Դիտարկել ստացված պրեպարատի հակաթունային ներուժը:
- Գնահատել հակաթույնի արդյունավետությունը՝ արդյունավետ միջին չափաքանակի (ED_{50}) և պաշտպանական արդյունավետության (R) արժեքների որոշմամբ:
- Գնահատել հակաթույնի հակահեմոռագիկ արդյունավետությունը:
- Որոշել հնարավոր ռեակտիվությունը այլ օձատեսակների, մասնավորապես ՀՀ տարածքում առկա մեկ այլ իժի՝ *Montivipera raddei*-ի, թույնի նկատմամբ:
- Գնահատել ՀՀ բուժփիմնարկներում առկա հակաթունային միջոցի արդյունավետությունը MLO-ի թույնի նկատմամբ:

Աշխատանքի գիտական նորույթը

- Առաջին անգամ ՀՀ-ում ստացվել է կենդանական ծագման, մոնոկլալենտ հակաթույն *Macrovipera lebetina* օձատեսակի *Macrovipera lebetina obtusa* ենթատեսակի թույնի դեմ: Տվյալ հակաթույնը իր մշակման դեռևս նախնական փուլում ցուցաբերել է արտահայտված հակաթունային ազդեցություն, մասնավորապես՝ *Macrovipera lebetina obtusa*-ի թույնի մահացու ազդեցության ակնհայտ ճնշում, վառ արտահայտված հակահեմոռագիկ, հակաֆոսֆոլիպազային, հակակազեինալիտիկ ազդեցություններ:
- Հետազոտությամբ բացահայտվել է, որ առկա է որոշակի փոխազդեցություն ՀՀ-ում տարածված մեկ այլ օձատեսակի՝ *Montivipera raddei*-ի և Իրանական *Montivipera latifi* թույների և ստացած հակաթույնի միջև, ինչը վկայում է հակածին/հակամարմին ռեակցիայի առկայության և օձատեսակների թույների հակածնային նմանության մասին:
- Գնահատվել է ՀՀ-ի բուժփաստաթուղթներում առկա և օձերի խայթոցների ժամանակ օգտագործվող UZBIOPHARM-ի պոլիվալենտ հակաթույնի MLO-ի թույնի մահացու ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողությունը, հակահեմոռագիկ ազդեցությունը, որոնք ցույց են տվել կիրառվող պրեպարատի նվազ արդյունավետությունը, ինչպես նաև կողմնակի ազդեցությունների առկայությունը:

Աշխատանքի գիտագործնական նշանակությունը

Macrovipera lebetina obtusa-ն հանդիսանում է տեսակի առավել մեծ աշխարհագրական արեալ ընդգրկող ենթատեսակը և նրա թույնը դրսևորում է բաղադրամասային բարձր բազմազանություն ու տարբերություններ այլ ենթատեսակների թույների նկատմամբ: Միևնույն ժամանակ Առողջապահության համաշխարհային կազմակերպության պաշտոնական կայքում նշվում է ընդամենը երեք գրանցված

հակաթունային միջոց, առանց ենթատեսակի նշման, անմիջապես օժատեսակի համար (Anti-viperin/Ալփիր; Gamma-Vip/ Թունիս; Polyvalent Snake Antivenom/Իրան) (<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>), իսկ Հայաստանում օգտագործվող ուզբեկական արտադրության հակաթույնը նույնիսկ ընդգրկված չէ այս ցուցակում: Հաշվի առնելով ՀՀ-ում հասանելի հակաթունային միջոցի իմունաբանական ծանր ընկալելիությունը, նվազ արդյունավետությունը և վերոհիշյալ փաստերը, մենք առաջարկում ենք տեղական արտադրության MLO-ի թույնի դեմ ստացված հակաթույն, որը արդեն իսկ նախնական հետազոտությունների ժամանակ ցույցաբերել է լավ որակական հատկություններ և հակաթունային արդյունավետություն, հանդիսանում է խիստ յուրահատուկ MLO ենթատեսակի համար: Սեփական արտադրության հակաթույնը ՀՀ-ի համար ունի ոչ միայն ռազմավարական նշանակություն, այլև՝ լինելով ենթատեսակի համար խիստ յուրահատուկ, կարող է արդյունավետ օգտագործվել տարածաշրջանի բազմաթիվ երկրներում MLO-ի խայթոցների դեպքում իրականացվող թերապիայի ժամանակ:

Աշխատանքի փորձարկումը և հրապարակումները

Ատենախոսության արդյունքները ներկայացվել են տարբեր սեմինարներում և միջազգային գիտաժողովներում: Հրատարակված են թեմայի հետ առնչվող 15 աշխատանք, որոնցից՝ 5 հոդված և 10 թեզիս:

Ատենախոսության կառուցվածքը և ծավալը

Ատենախոսության ծավալը կազմում է 115 էջ: Այն բաղկացած է հապավումների ցանկից, ներածությունից, գրականության ակնարկից, հետազոտության նյութի և մեթոդների նկարագրությունից, սեփական հետազոտության արդյունքներից և դրանց քննարկումից, եզրակացություններից, օգտագործված գրականության ցանկից (149 հեղինակ): Ատենախոսությունը պարունակում է 34 նկար և 15 աղյուսակ:

ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Ուսումնասիրության շրջանակներում *Macrovipera lebetina obtusa*-ի թույնի դեմ հակաթույնը ստացվել է 2 արու ճագարների (1.8/2 կգ) և խոյի (40 կգ) MLO-ի թույնի փոքր, աճող չափաքանակներով գերիմունիզացման ճանապարհով: Թույնի ներարկման ժամանակացույցին համապատասխան չափաբաժինները ներարկվել են ճագարներին՝ ազդրային հատվածից (ներմկանային) (աղ. 1,2), խոյին՝ պարանոցային հատվածից (ենթամաշկային) (աղ. 3,4):

Աղյուսակ 1. Ճագարների գերիմունիզացման առաջին ժամանակացույցը և օգտագործված թույնի չափաքանակները:

Շաբաթ	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10		11	
Ներարկվող թույնի լուծույթի ծավալ (մլ)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1.5	1	1.5
Թույնի քանակություն (մկգ)	50	100	150	200	250	300	500	750	50	150	500	900	1000	1800

Աղյուսակ 2. Ճագարների գերիմունիզացման երկրորդ ժամանակացույցը և օգտագործված թույնի չափաքանակները:

Շաբաթ	1	2	4	6	8
ներարկվող թույնի լուծույթի ծավալ (մլ)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
թույնի քանակություն (մկգ)	150	300	450	600	750

Աղյուսակ 3. MLO-ի թույնով խոյի գերիմունիզացման առաջին փուլի ժամանակացույցը և օգտագործված թույնի չափաքանակները:

Շաբաթ	1	2	3	4	5	6	7	8
ներարկվող թույնի լուծույթի ծավալ (մլ)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	1	1.5
թույնի քանակություն (մկգ)	1	2	3	4	5	6	10	15

Աղյուսակ 4. MLO-ի թույնով խոյի գերիմունիզացման երկրորդ փուլի ժամանակացույցը և օգտագործված թույնի չափաքանակները:

Շաբաթ	9		10		11	
ներարկվող թույնի լուծույթի ծավալ (մլ)	0.1	0.3	1	1.8	1	1.8
թույնի քանակություն (մկգ)	1	3	10	18	20	13

Կենդանատեսակների գերիմունիզացումից հետո իրականացվել է արյան հավաք, արյունը ճագարներից վերցվել է ականջների զարկերակներից, խոյից՝ լծային արյունադարձ երակներից, որից հետո այն ցենտրիֆուգվել է (3000 պտույտ/ր, 10ր) և անջատվել է շիճուկը, որը պահվել է -4°C պայմաններում:

Հաջորդ փուլում իրականացվել է կենդանիների իմունիտետի խթանման արդյունքում մակաձված հակամարմինների անջատում շիճուկից կապրիլաթթվի օգտագործմամբ (5% զանգված/ծավալ): Այնուհետև ստացված արտադրանքը երկու անգամ դիալիզի է ենթարկվել (որպես միջավայր համապատասխանաբար օգտագործվել է 0.9%-ոց NaCl-ի լուծույթ և պոլիէթիլենգլիկոլ 4000) կապրիլաթթվի մնացորդների հեռացման և հակաթունային հակամարմինների խտացման նպատակով:

MLO-ի թույնի դեմ ստացված հակաթույնի արդյունավետության և խաչաձև ռեակտիվության գնահատում

Ճագարից ստացված հակաթույնի առաջին խմբաքանակի հակաթունային ներուժի դիտարկումը իրականացվել է MLO-ի թույնի միջին մահացու չափաբաժնի տարբեր քանակությունների ($LD_{50}=18.4$ մկգ/մուկ) հետ հակաթույնի *in vitro* ինկուբացումով (37°C , 30ր) և հետագա ներարկումով (պոչային երակից) մկներին

(20±2գ), որից հետո կենդանիները 24 ժամվա ընթացքում ենթարկվել են մշտադիտարկման, գրանցվել են մահվան դեպքերը:

Ճագարից ստացված հակաթոյնի երկրորդ խմբաքանակի որակական գնահատականը տրվել է կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով, որից հետո արդյունավետությունը գնահատվել է վերը նկարագրված մեթոդով: Դիտվել է նաև սույն խմբաքանակի խաչաձև ռեակտիվությունը այլ օժատեսակների թոյների նկատմամբ իմունադիֆուզիայի թեստի միջոցով, ըստ Ouchterlony և Nilsson-ի:

Խոյից ստացված հակաթոյնը ևս ենթարկվել է կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի, որից հետո իրականացվել է հակաթոյնի արդյունավետության գնահատում վերոհիշյալ ձևով, սակայն այս անգամ MLO-ի թոյնի 5LD₅₀ չափաքանակները ինկուբացվել են հակաթոյնի տարբեր նոսրացումների հետ (մինչև մկներին ներարկելը):

Օգտագործելով վերոհիշյալ մեթոդով, մշտադիտարկման արդյունքում ստացված տվյալները, հաշվարկվել է հակաթոյնի միջին արդյունավետ չափաքանակը (ED₅₀) ըստ Spearman-Kärber-ի մեթոդի, որի միջոցով էլ որոշվել է հակաթոյնի պաշտպանական արդյունավետությունը (R):

Խոյից ստացված հակաթոյնի հակահեմոռագիկ ազդեցությունը գնահատվել է առնետների վրա (200±10գ), որոնց ներմաշկային ներարկվել է թոյն/հակաթոյն ինկուբացված (37°C, 30ր) խառնուրդը (տարբեր հարաբերություններով), 24 ժամ անց կենդանիները քնեցվել են, հեռացվել է մաշկը ներարկման հատվածում և որոշվել են հեմոռագիայի բնութագրերը:

Քանի որ իժերի թոյների վառ արտահայտված թունավոր ազդեցությունները առավելապես պայմանավորված են ֆոսֆոլիպազ A₂-ով և մետաղապրոտեազներով, գնահատվել են հակաթոյնի հակաֆոսֆոլիպազային և հակակազեինալիտիկ ազդեցությունները (թոչնածվի դեղնուցի և կաթի մոդելների վրա):

Հակաթոյնի սույն խմբաքանակը ևս ենթարկվել է իմունադիֆուզիայի թեստի:

Ստացված արդյունքները համեմատվել են ՀՀ բուժհաստատություններում առկա և օձերի խայթոցների ժամանակ օգտագործվող UZBIOPHARM-ի արտադրության հակաթունային միջոցի նմանատիպ որակական բնութագրերի և արդյունավետության հետ:

ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ

Ճագարներից ստացված արտադրանքի հակաթունային ներուժի գնահատում

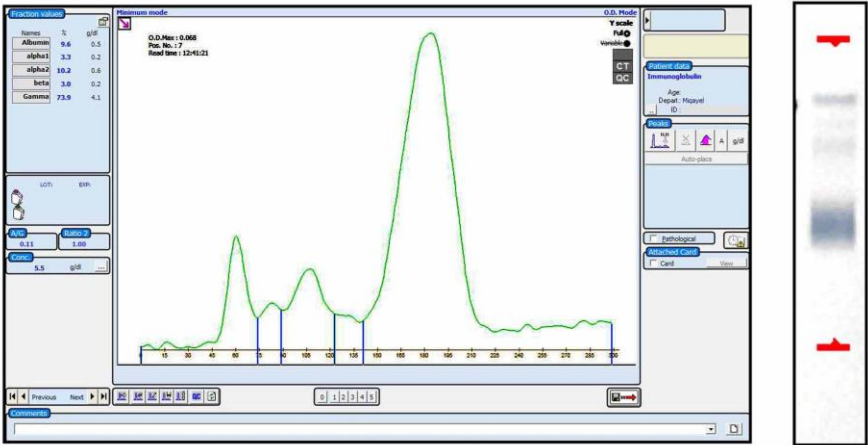
Ճագարների գերիմունիզացման արդյունքում արտադրված, շիճուկում առկա հակամարմինների կապրիլաթթվով մաքրման միջոցով ստացվել է հակաթոյնի առաջին խմբաքանակը, որի MLO-ի թոյնի մահաբեր ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողությունը դիտարկվել է մկների վրա: Այսպես MLO-ի թոյնի մահացու միջին չափաքանակի տարբեր քանակություններ (LD₅₀ =18.4 մկգ/մուկ) լուծվել են 0.1մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթում, ինկուբացվել 0.1մլ-ական հակաթոյնի հետ (նախապես 10 անգամ նոսրացված), ցենտրիֆուգվել, ներարկվել մկներին և իրականացվել 24 ժամյա մշտադիտարկում: Թոյնի 4LD₅₀/6LD₅₀ չափաքանակների և հակաթոյնի օգտագործման պարագայում բոլոր մկները

սատկել են, իսկ ահա $2LD_{50}$ /հակաթյունի ժամանակ բոլոր մկները կենդանի են մնացել (աղ. 5):

Աղյուսակ 5. Ստացված հակաթյունի առաջին խմբաքանակի MLO-ի թյունի մահաբեր ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողության դիտարկման արդյունքները:

	ներարկման	մկների քանակություն			մահվան
	ծավալ (մլ/մուկ)	սատկած	կենդանի	ընդհանուր	տոկոս (%)
$2LD_{50}$ /հակաթյուն	0.2	0	4	4	0
$4LD_{50}$ /հակաթյուն	0.2	4	0	4	100
$6LD_{50}$ /հակաթյուն	0.2	4	0	4	100

Հաջորդ ճազարի իմունիզացումից (աղ. 2) ստացված հակաթյունային արտադրանքում հակամարմինների որակական գնահատականը տրվել է (հակաթյունում առկա հակամարմիններ/ոչ ակտիվ պեպտիդային բաղադրամասեր) կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով: Հակաթյունում γ գլոբուլինները կազմում են սպիտակուցային ֆրակցիաների 73.9%-ը, ունենալով 4.1 գ/դլ կոնցենտրացիա (նկ. 1):



Նկար 1. Գերիմունիզացված ճազարից ստացված հակաթյունի կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի արդյունքները:

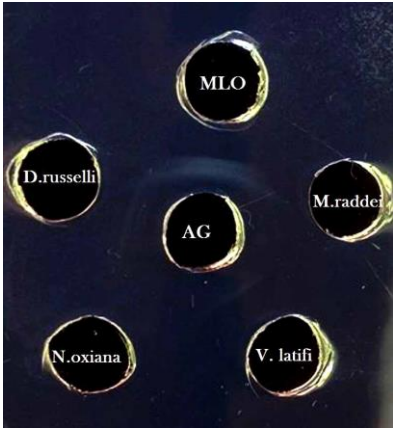
Այս խմբաքանակի համար ևս գնահատվել է թյունի մահացու ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողությունը: MLO-ի թյունի LD_{50} -ի տարբեր քանակներ լուծվել են 0.25մլ ֆիզիոլոգիական լուծույթում, ինկուբացման ենթարկվել 0.25մլ հակաթյունի հետ (այսինքն օգտագործվել է հակաթյունի ավելի մեծ ծավալ, որը նոսրացված է եղել ընդամենը 2 անգամ), ցենտրիֆուգվել և ներարկվել մկներին, իրականացվել է 24 ժամյա մշտադիտարկում: 2.5 և $5LD_{50}$ /հակաթյուն (թյուն/հակաթյուն) խառնուրդների պարագայում գրանցվել է փորձարարական կենդանիների 25%-ի մահ, LD_{50} /հակաթյուն-ի դեպքում բոլոր մկները կենդանի են մնացել: Այս տվյալները վկայում են ինչպես հակաթյունի

չեզոքացնող պոտենցիալի առկայության, այնպես էլ՝ օգտագործված հակաթույնի ծավալների մեծացմանը զուգահեռ արդյունավետության բարձրացման մասին (աղ. 6):

Աղյուսակ 6. Հակաթույնի երկրորդ խմբաքանակի MLO-ի թույնի մահաբեր ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողության գնահատման արդյունքները:

	ներարկման	մկների քանակություն			մահվան
	ծավալ (մլ/մուկ)	սատկած	կենդանի	ընդհանուր	տոկոս (%)
LD ₅₀ /հակաթույն	0.5	0	4	4	0
2.5LD ₅₀ /հակաթույն	0.5	1	3	4	25
5LD ₅₀ /հակաթույն	0.5	1	3	4	25

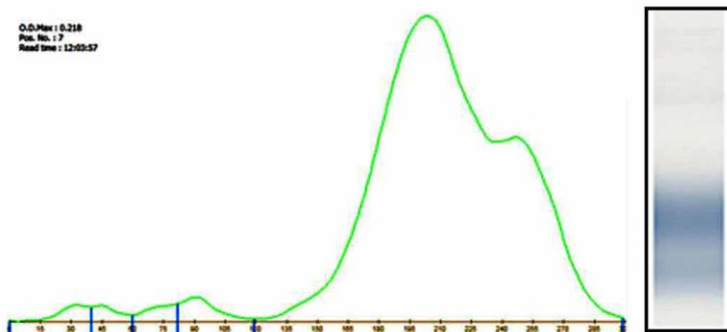
Ուսումնասիրվել է նաև հակաթույնի տվյալ խմբաքանակի հակամարմինների խաչաձև ռեակտիվությունը այլ օժատեսակների թույների նկատմամբ (նկ. 2): Ճագարից ստացված հակաթույնի ու MLO-ի թույնի միջև առկա փոխազդեցության լայն բիժը վկայում է հակաձին/հակամարմին բավականին լավ ռեակցիայի մասին: *Daboia russelii*, *Montivipera raddei* և *Montivipera latifi* իժերի թույների հետ դիտվում է փոխազդեցության մեկ նեղ բիժ (MR-ի պարագայում դժվար նկատելի), իսկ ահա միջինասիական կոբրայի (*Naja oxiana*) թույնի հետ ընդհանրապես փոխազդեցություն չի գրանցվել:



Նկար 2. Ճագարից ստացված հակաթույնի խաչաձև ռեակտիվությունը տարբեր օժատեսակների թույների նկատմամբ (կրկնակի դիֆուզիայի թեստ)։ MLO-*Macrovipera lebetina obtusa*-ի թույն, *M. raddei*-*Montivipera raddei*-ի թույն, *V. latifi*-*Montivipera latifi*-ի թույն, *D. russelli*- *Daboia russelii*-ի թույն, *N. oxiana*-*Naja oxiana*-ի թույն:

MLO-ի թույնով խոյի գերիմունիզացման արդյունքում ստացված արտադրանքի հակաթունային ներուժի գնահատում

Խոյի գերիմունիզացումից ստացված հակաթույնի որակական գնահատականը տրվել է (հակաթույնում առկա հակամարմիններ/ոչ ակտիվ պեպտիդային բաղադրամասեր) կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով: Էլեկտրաֆորեզի գելում դիտվում է γ և $\beta 2$ գլոբուլինային բիժ, որը կազմում է սպիտակուցային ֆրակցիաների 94.8%-ը, 3.5 գ/դլ սպիտակուցի կոնցենտրացիայի պայմաններում (նկ. 3, աղ. 7):



Նկար 3. Գերիմունիզացված խոյից ստացված հակաթոյնի կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի արդյունքները:

Աղյուսակ 7. Գերիմունիզացված խոյից ստացված հակաթոյնի սպիտակուցային ֆրակցիաների կոնցենտրացիան:

սպիտակուցային ֆրակցիաներ	արդյունք %	արդյունք գ/դլ
ալբումին	1.2	0.47
$\alpha 1$	0.9	0.2
$\alpha 2$	1.2	0.5
$\beta 1$	1.9	0.4
$\beta 2+\gamma$	94.8	3.5

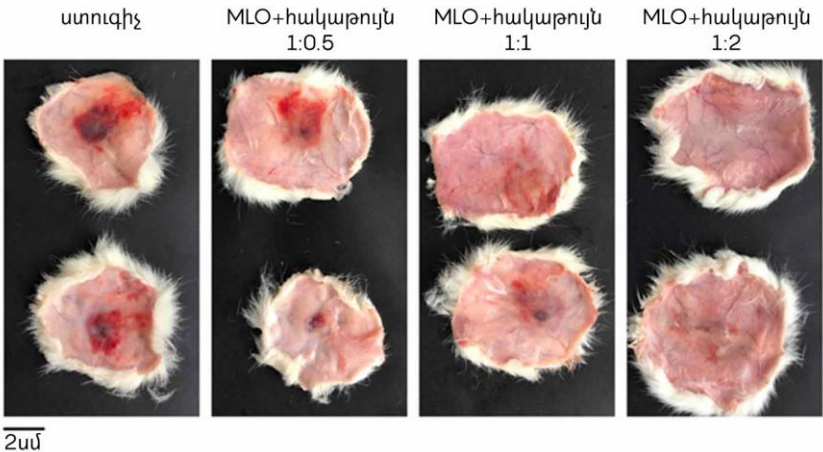
Խոյից ստացված հակաթոյնի արդյունավետությունը որոշվել է MLO-ի թոյնի 5LD₅₀-ի չափաքանակի համար (92մկգ/մուկ)՝ հակաթոյնի տարբեր նոսրացումների օգտագործմամբ: Ստուգիչ խմբի մկներին ներարկվել է միայն թունային լուծույթ, մնացած խմբերին՝ թոյնի 5LD₅₀-ի չափաքանակները (լուծված 0.25մլ 0.9%-ոց NaCl-ի լուծույթում)՝ նախապես ինկուբացված հակաթոյնի տարբեր նոսրացումների հետ (նոսրացման գործակից (նգ)՝ 2/4/8 և առանց նոսրացման), իրականացվել է 24 ժամյա մշտադիտարկում: Ստուգիչ խմբի մկները MLO-ի թոյնի 5LD₅₀ չափաքանակի ներարկումից անմիջապես հետո սատկել են, միջդեռ հակաթոյնի օգտագործման պարագայում մահացության տոկոսը հակաթոյնի նոսրացմանը հակադարձ հարաբերական սկսել է նվազել և արդեն իսկ հակաթոյնի 2 անգամ նոսրացման ժամանակ դիտվել է թոյնի մահացու ազդեցության լրիվ չեզոքացում (աղ. 8): Այս տվյալների օգտագործմամբ հաշվարկվել է հակաթոյնի արդյունավետ միջին չափաքանակը (ED₅₀), որը կազմում է 0.05257 մլ/մուկ կամ 2.6285 մլ/կգ: ED₅₀-ի արժեքի օգտագործմամբ որոշվել է հակաթոյնի պաշտպանական արդյունավետությունը՝ R=76:

Աղյուսակ 8. Խոյից ստացված հակաթոյնի MLO-ի թոյնի մահաբեր ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողության դիտարկման արդյունքները:

	ներարկման ծավալ (մլ/մուկ)	հակաթոյնի ծավալ (մլ/մուկ)	մկների քանակություն			մահվան տոկոս (%)
			սատկած	կենդանի	ընդհանուր	
5LD ₅₀ /հակաթոյն	0.5	0.25	0	4	4	0
5LD ₅₀ /հկ(նq=2)	0.5	0.125	0	4	4	0
5LD ₅₀ /հկ(նq=4)	0.5	0.625	2	2	4	50
5LD ₅₀ /հկ(նq=8)	0.5	0.03125	3	1	4	75
5LD ₅₀	0.5	-	4	0	4	100

MLO-ի թոյնով խոյի գերիմունիզացման արդյունքում ստացված հակաթոյնի հակահեմոռագիկ կարողության գնահատում

Խոյից ստացված հակաթոյնի հակահեմոռագիկ կարողության գնահատման համար փորձարարական առնետներին (յուրաքնչայուր խմբում 2 արու առնետ, 200±10գ) ներարկվել է թոյն, թոյն/հակաթոյն ինկուբացված և ցենտրիֆուգված խառնուրդը (թոյն/հակաթոյն (ծավալ/ծավալ)՝ 1/0.5; 1/1; 1/2): Հակահեմոռագիկ արդյունավետության արդյունքները դուրս են բերվել երկու առնետներից ստացված հեմոռագիայի բնութագրերի միջինացված արժեքների տեսքով: Ստուգիչ խմբի մոտ դիտվել է ծավալուն հեմոռագիկ պատկեր, մնացած խմբերում՝ հակաթոյնի ծավալի մեծացմանը զուգահեռ հեմոռագիայի բնութագրերը սկսել են նվազել, այսպես՝ թոյն/հակաթոյն 1/0.5 և 1/1 հարաբերությունների դեպքում, ստուգիչի համեմատ դիտվել է հեմոռագիայի բնութագրերի 55.5% և 71.5% նվազում, իսկ 1/2 հարաբերության դեպքում հեմոռագիա ընդհանրապես չի գրանցվել (նկ. 4):



Նկար 4. Խոյից ստացած հակաթոյնի հակահեմոռագիկ ազդեցության գնահատման արդյունքները: Ստուգիչ խմբին ներարկվել է միայն MLO-ի թունային լուծույթ, մնացած խմբերին թոյն/հակաթոյն ինկուբացված խառնուրդը (հակաթոյնի տարբեր ծավալների օգտագործմամբ):

MLO-ի թույնով խոյի գերիմունիզացման արդյունքում ստացված հակաթույնի հակաֆոսֆոլիպազային և հակակազեինալիտիկ ակտիվության գնահատում

Հակաթույնի հակաֆոսֆոլիպազային ակտիվության գնահատման համար յուրաքանչյուր փորձանոթների մեջ լցվել է 0.25մլ թռչնածվի դեղնուց: Փորձանոթները բաժանվել են 4 խմբի, որից հետո, ստուգիչ խմբի փորձանոթների մեջ ավելացվել է 0.3մլ նատրիում-ֆոսֆորական բուֆեր (PBS), երկրորդ խմբի յուրաքանչյուր փորձանոթի մեջ 0.3մլ MLO-ի թունային լուծույթ (լուծված PBS-ի մեջ, 2մգ/0.8մլ), երրորդ և չորրորդ խմբերի փորձանոթների մեջ 0.3մլ-ական թույն/հակաթույն խառնուրդ (ինկուբացված 30ր, 37°C պայմաններում), հակաթույնի 2 անգամ նոսրացմամբ և առանց նոսրացման (հակաթույնի 2 անգամ նոսրացման դեպքում 0.4մլ հակաթույնին ավելացվել է 0.4մլ PBS, որի մեջ լուծված է եղել 2մգ թույն, վերցվել՝ 0.3մլ, առանց նոսրացման-ի ժամանակ անմիջապես 0.8 հակաթույնի մեջ լուծվել է 2մգ թույն, վերցվել՝ 0.3մլ): Այնուհետև փորձանոթները 20-30ր պահվել են ջրային բաղնիքում (98°C): Ստուգիչ խմբում, եռացման արդյունքում, ձվի դեղնուցը պնդանում է, մինչդեռ միայն MLO-ի թույնի ազդեցությամբ այն մնում է հեղուկ վիճակում: Երկու անգամ նոսրացված հակաթույնի օգտագործման պարագայում, արդեն զգացվել է հակաթույնի հակաֆոսֆոլիպազային ակտիվությունը, իսկ չնոսրացված հակաթույնի օգտագործման պարագայում եռացված զանգվածը համարյա լրիվ պինդ է մնացել, այսինքն ակնհայտորեն ճնշված է եղել թույնի ֆոսֆոլիպազ A_2 -ի ակտիվությունը (նկ. 5):



ստուգիչ(0.3մլ PBS)
 MLOթույն/հակաթույն(հակաթույնը առանց նոսրացման, 0.3մլ)
 MLOթույն/հակաթույն(հակաթույնը 2 անգամ նոսրացրած, 0.3մլ)
 MLOթույն լուծված PBS-ում(0.3մլ)



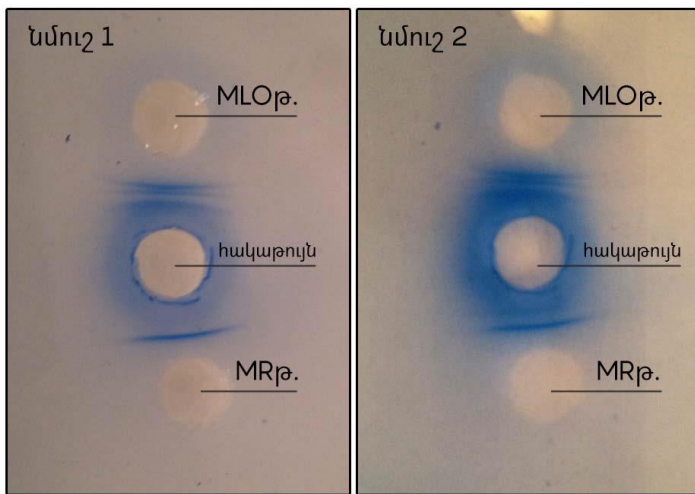
ստուգիչ(0.1մլ PBS)
 MLOթույն/հակաթույն(հակաթույնը առանց նոսրացման, 0.1մլ)
 MLOթույն/հակաթույն(հակաթույնը 2 անգամ նոսրացրած, 0.1մլ)
 MLOթույն լուծված PBS-ում(0.1մլ)

Նկար 5. Խոյից ստացված հակաթույնի հակաֆոսֆոլիպազային և հակակազեինալիտիկ ազդեցության գնահատման արդյունքները:

Համանման ձևով գնահատվել է նաև հակաթույնի հակակազեինալիտիկ ակտիվությունը, այս դեպքում փորձանոթների մեջ լցվել է 0.5մլ-ական կաթ: Փորձանոթները բաժանվել են 4 խմբի, որից հետո, ստուգիչ խմբի փորձանոթների մեջ ավելացվել է 0.3մլ PBS, երկրորդ խմբի փորձանոթների մեջ 0.1մլ MLO-ի թունային լուծույթ (լուծված PBS-ի մեջ, 2մգ/0.8մլ), երրորդ և չորրորդ խմբերի փորձանոթների մեջ 0.1մլ-ական թույն/հակաթույն խառնուրդ (ինկուբացված 30ր, 37°C պայմաններում), հակաթույնի 2 անգամ նոսրացմամբ և առանց նոսրացման (հակաթույնի 2 անգամ նոսրացման դեպքում

0.4մլ հակաթոյնին ավելացվել է 0.4մլ PBS, որի մեջ լուծված է եղել 2մգ թոյն, վերցվել 0.1մլ, առանց նոսրացման-ի ժամանակ անմիջապես 0.8մլ հակաթոյնի մեջ լուծվել է 2մգ թոյն, վերցվել 0.1մլ): Ստուգիչ խմբում կաթը գտնվել է հեղուկ վիճակում, մինչդեռ միայն MLO-ի թունային լուծույթի ավելացման պարագայում այն մակարդվել է: Երկու անգամ նոսրացված հակաթոյնի օգտագործման ժամանակ շատ թեթևակի զգացվել է հակաթոյնի հակակազեինալիտիկ ակտիվությունը, իսկ չնոսրացված հակաթոյնի օգտագործման պարագայում կաթը համարյա չի մակարդվել, բացակայել են ագրեգատները, այսինքն ևս դիտվել է թոյնի կազեինալիտիկ ակտիվության ակնհայտ ճնշում (նկ. 6):

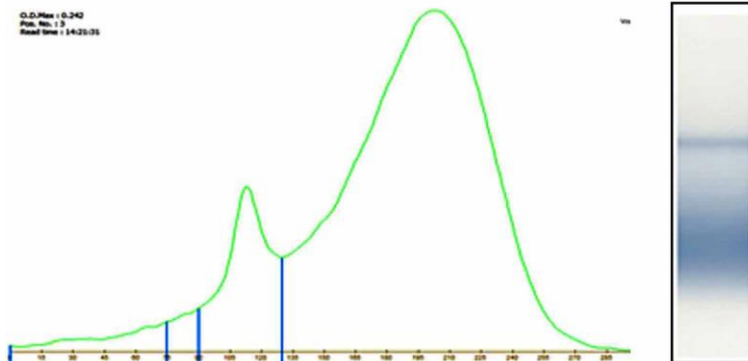
Ուսումնասիրվել է նաև հակաթոյնի սույն խմբաքանակի հակամարմինների խաչաձև ռեակտիվությունը *Montivipera raddei* օձատեսակի թոյնի նկատմամբ (նկ. 7): Խոյից ստացված հակաթոյնի ու MLO-ի թոյնի միջև գրանցվել են փոխազդեցության երկու բժեր, վկայելով հակաձին/հակամարմին բավականին լավ ռեակցիայի մասին: *Montivipera raddei* թոյնի հետ դիտվել է փոխազդեցության մեկ, ևս լավ արտահայտված բիծ, որը վկայում է սույն մոնոկլոնալ հակաթոյնի և MR-ի թոյնի միջև առկա ռեակտիվության մասին:



Նկար 7. Խոյից ստացված հակաթոյնի խաչաձև ռեակտիվությունը *Montivipera raddei*-ի և *Macrovipera lebetina obtusa*-ի թոյնների նկատմամբ (կրկնակի դիֆուզիայի թեստ). MLO-*Macrovipera lebetina obtusa*-ի թոյն, MR-*Montivipera raddei*-ի թոյն:

Հայաստանում առկա և օձերի խայթոցների ժամանակ օգտագործվող ուզբեկական արտադրության հակաթունային միջոցի արդյունավետության գնահատումը

Ուզբեկական արտադրության հակաթունային միջոցի հակամարմինների որակական գնահատականը տրվել է (հակաթոյնում առկա հակամարմիններ/ոչ ակտիվ պեպտիդային բաղադրամասեր) կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի միջոցով: Էլեկտրաֆորեզի գելում դիտվում է γ , $\beta 1$, $\beta 2$ գլոբուլինային բիծ, որը կազմում է սպիտակուցային ֆրակցիաների 82.4%-ը (նկ. 8, աղ. 9):



Նկար 8. UZBIOPHARM-ի արտադրության հակաթունային միջոցի կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզի արդյունքները:

Աղյուսակ 9. UZBIOPHARM-ի արտադրության հակաթունային միջոցի սպիտակուցային ֆրակցիաների կոնցենտրացիան:

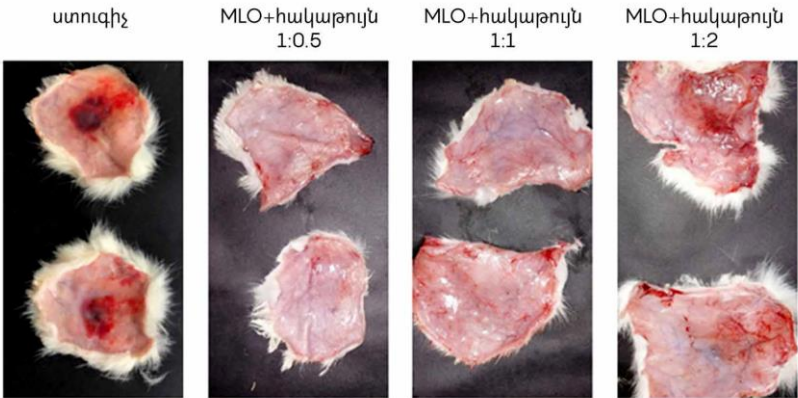
սպիտակուցային ֆրակցիաներ	արդյունք %
ալբումին	3.2
$\alpha 1$	1.7
$\alpha 2$	12.7
$\beta 1 + \beta 2 + \gamma$	82.4

Ուզբեկական արտադրության հակաթույնի արդյունավետության գնահատման շրջանակներում իրականացվել է MLO-ի թույնի $5LD_{50}$ -ի չափաքանակի (92մկգ/մուկ) մահացու ազդեցության չեզոքացման գնահատում՝ հակաթունային միջոցի տարբեր նոսրացումների օգտագործմամբ: Ստուգիչ խմբի մկներին ներարկվել է միայն թունային լուծույթ, մնացած խմբերին թույնի $5LD_{50}$ -ի չափաքանակները (լուծված 0.25մլ 0.9%-ոց NaCl-ի լուծույթում), նախապես ինկուբացված հակաթունային միջոցի տարբեր նոսրացումների հետ (նոսրացման գործակից (նգ)՝ 2/4/8 և առանց նոսրացման) և իրականացվել է 24 ժամյա մշտադիտարկում: Ստուգիչ խմբի մկները MLO-ի թույնի $5LD_{50}$ չափաքանակի ներարկումից անմիջապես հետո սատկել են, միջոցի հակաթույնի օգտագործման դեպքում դիտվել է հետևյալ պատկերը՝ առանց նոսրացման հակաթունային միջոցի օգտագործման պարագայում սատկել են փորձարարական կենդանիների 50%-ը, երկու անգամ նոսրացման պարագայում ընդամենը մեկ կենդանի է սատկել, իսկ ահա 4 անգամ նոսրացման ժամանակ բոլոր կենդանիները ողջ են մնացել: Պատկերը այնպիսին է, որ կարծես հակաթունային միջոցը կենդանիների վրա թողնում է բացասական ազդեցություն, որը հակաթույնի նոսրացմանը զուգահեռ նվազում է:

Աղյուսակ 10. Ուզբեկական արտադրության հակաթունային միջոցի MLO-ի թույնի մահաբեր ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողության դիտարկման արդյունքները:

	ներարկման ն ծավալ (մլ/մուկ)	հակաթույնի ծավալ (մլ/մուկ)	մկների քանակություն			մահվան տոկոս (%)
			սատկած	կենդանի	ընդհանուր	
5LD ₅₀ /հակաթույն	0.5	0.25	2	2	4	50
5LD ₅₀ /հկ(նզ=2)	0.5	0.125	1	3	4	25
5LD ₅₀ /հկ(նզ=4)	0.5	0.625	0	4	4	0
5LD ₅₀ /հկ(նզ=8)	0.5	0.03125	3	1	4	75
5LD ₅₀	0.5	-	4	0	4	100

Ուզբեկական արտադրության հակաթունային միջոցի հակահեմոռագիկ կարողության գնահատման համար փորձարարական առնետներին (յուրաքանչյուր խմբում 2 արու առնետ, 200±10գ) ներարկվել է թույն, թույն/հակաթույն ինկուբացված և ցենտրիֆուգված խառուրդը (թույն/հակաթույն (ծավալ/ծավալ)՝ 1/0.5; 1/1; 1/2): Հակահեմոռագիկ արդյունավետության արդյունքները դուրս են բերվել երկու առնետներից ստացված հեմոռագիայի բնութագրերի միջինացված արժեքների տեսքով: Ստուգիչ խմբի մոտ գրանցվել է ծավալուն հեմոռագիկ պատկեր, մնացած խմբերում դիտվել է հետևյալ պատկերը՝ հակաթույնի չնոսրացման և 2 անգամ նոսրացման պարագայում, հեմոռագիա չի գրանցվել, իսկ հակաթունային միջոցի 2 անգամ ավելի շատ ծավալի օգտագործման դեպքում դիտվել է հեմոռագիայի առաջացում (հեմոռագիայի բնութագրերը ստուգիչից 55.5%-ով ցածր են եղել) (նկ. 9):



Նկար 9. Ուզբեկական արտադրության հակաթույնի հակահեմոռագիկ ազդեցության գնահատման արդյունքները: Ստուգիչ խմբին ներարկվել է միայն MLO-ի թունային լուծույթ, մնացած խմբերին՝ թույն/հակաթույն ինկուբացված խառնուրդը (հակաթունային միջոցի տարբեր ծավալների օգտագործմամբ):

Այսպիսով, առաջին անգամ ՀՀ-ում կենդանական ծագման մոնոկլոնալ հակաթոյն է ստացվել *Macrovipera lebetina obtusa* ենթատեսակի թոյնի դեմ՝ MLO-ի թոյնի փոքր աճող չափաքանակներով փորձարարական կենդանիների գերիմունիզացման ճանապարհով:

Ճագարից ստացված հակաթոյնի MLO-ի թոյնի մահաբեր ազդեցությունը չեզոքացնելու կարողության դիտարկումները ցույց են տվել, որ արդեն իսկ թոյնի $2LD_{50}$ չափաքանակի դեպքում դիտվում է հակաթոյնի պաշտպանական կարողությունը: Տվյալ հակաթոյնի որակական բնութագրումը կենսաքիմիական վերլուծության և գել-էլեկտրաֆորեզով ցույց է տվել γ գլոբուլինների 73.9% պարունակություն: Այսպես, ըստ գրականության առկա տվյալների կապրիլաթթվով մաքրման ժամանակ IgG-ն կարող է անջատվել 90%-ից բարձր մաքրությամբ, 60-65% ելքով, հետևաբար արդյունքները վկայում են ստացված հակաթոյնի բավարար որակական հատկությունների մասին և ցույց են տվել, որ հակաթոյնի ծավալների մեծացմանը զուգահեռ հակաթոյնի արդյունավետությունը բարձրանում է: Այլ օժատեսակների թոյների նկատմամբ խաչաձև ռեակտիվության թեստի արդյունքում պարզվել է, որ հակաթոյնը բացի MLO-ի թոյնի նկատմամբ հակաձին/հակամարմին լավ արտահայտված ռեակցիայից, որոշակի փոխազդեցությունների մեջ է մտնում *Daboia russelii*, *Montivipera raddei* և *Montivipera latifi* օժատեսակների թոյների հետ:

Խոյի գերիմունիզացման արդյունքում ստացված հակաթոյնի արդյունավետության գնահատումը ցույց է տվել, որ MLO-ի թոյնի $5LD_{50}$ չափաքանակի մահացու ազդեցությունը նվազում է՝ հակաթոյնի նոսրացմանը հակադարձ հարաբերական, և արդեն հակաթոյնի երկու անգամ նոսրացման դեպքում դիտվում է թոյնի մահացու ազդեցության լրիվ չեզոքացում, արդյունավետ միջին չափաքանակը (ED_{50}), այսինքն հակաթոյնի այն միավոր ծավալը, որը ունակ է չեզոքացնել թոյնի $5LD_{50}$ չափաքանակը, կազմում է **0.05257 մլ/մուկ կամ 2.6285 մլ/կգ**: Հակաթոյնի պաշտպանական արդյունավետությունը (R), այսինքն թոյնի միջին մահացու չափաբաժնի այն քանակությունը, որը չեզոքացվում է 1մլ չնոսրացված հակաթոյնով, կազմում է **76**:

Խոյից ստացված հակաթոյնի հակահեմոռագիկ կարողության գնահատումը ցույց է տվել թոյնի հեմոռագիկ ազդեցության ակնհայտ ճնշում:

Հակաթոյնի հակաֆոսֆոլիպազային ու հակակազեինալիտիկ ակտիվության գնահատման փորձերը ցույց են տվել, որ չնոսրացված հակաթոյնի օգտագործման պարագայում, MLO-ի թոյնի ֆոսֆոլիպազ A_2 -ի ինչպես նաև, մետաղապրոտեազներով պայմանավորված, թոյնի կազեինալիտիկ ակտիվությունները լրիվ ճնշվում են:

Եզրակացություններ

1. Առաջին անգամ Հայաստանում ստացվել է գյուրզայի թույնի դեմ կենդանական ծագման յուրահատուկ մոնոկլոնալ հակաթույն, որը նաև որոշակի ռեակտիվություն է ցուցաբերում Հայկական իժի և Լաթիֆի իժի թույների նկատմամբ:
2. Որակական գնահատականը ցույց է տալիս, որ հակաթունային հակամարմինները՝ γ գլոբուլինները, կազմում են հակաթույնի սպիտակուցային ֆրակցիաների 73.9%-94.8%-ը:
3. Հակաթույնի արդյունավետ միջին չափաքանակը կազմում է 2.6285 մլ/կգ, իսկ պաշտպանական արդյունավետությունը՝ $R=76$, և այս տվյալները լիովին մրցակցում են աշխարհում փորձարարական մի շարք արտադրանքների նմանատիպ բնութագրերի հետ:
4. Հակահեմոռագիկ կարողության գնահատումը ցույց է տալիս թույնի հեմոռագիկ ազդեցության ակնհայտ ճնշում, չնոսրացված և երկու անգամ նոսրացված հակաթույնի օգտագործման դեպքում դիտվում է հեմոռագիկ էֆեկտի 71.5% և 55.5% նվազում, իսկ թույն/հակաթույն 1/2 ծավալային հարաբերության դեպքում՝ հեմոռագիայի բացակայություն:
5. Հակաթույնը ցուցաբերում է ակնհայտ հակաֆոսֆոլիպազային (թունային ֆոսֆոլիպազ A_2) և հակակազեինալիտիկ ակտիվություն:
6. ՀՀ բուժհաստատություններում առկա և օժերի խայթոցների ժամանակ օգտագործվող UZBIOPHARM-ի արտադրության հակաթույնը (*Serum contra venenum Viperae lebetinae, Echis carinati, Najae oxianae*) ցուցաբերում է նվազ արդյունավետություն MLO-ի թույնի մահացու և հեմոռագիկ ազդեցությունների նկատմամբ:

Առենախոսության թեմայով տպագրված աշխատությունների ցուցակը

1. Ghazaryan NA, Ghulikyan L, Kishmiryan A, Andreeva TV, Utkin YN, Tsetlin VI, Lomonte B, Ayvazyan NM, Phospholipases a2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1848(2):463-8 ([doi: 10.1016/j.bbamem.2014.10.037](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.037)).
2. Ghazaryan NA, Ghulikyan LA, Kishmiryan AV, Kirakosyan GR, Nazaryan OH, Ghevondyan TH, Zakaryan NA, Ayvazyan NM, Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. *Eur J Pharmacol*. 2015 Oct 5;764:340-5 ([doi: 10.1016/j.ejphar.2015.07.011](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.011)).
3. L. A. Ghulikyan , M. Mohamadvarzi, G. V. Ghukasyan, A. V. Kishmiryan, N. A. Zaqaryan, G. R. Kirakosyan, N. M. Ayvazyan, Molecular events associated with viperalatifivenom effect on condition of human red blood cells. *PROCEEDINGS OF THE YEREVAN STATE UNIVERSITY*, 2016, № 2, p. 43–50 (<http://ysu.am/science/en/1465212714>).
4. Kirakosyan G, Mohamadvarzi M, Ghulikyan L, Zaqaryan N, Kishmiryan A, Ayvazyan N, Morphological and functional alteration of erythrocyte ghosts and giant unilamellar vesicles caused by *Vipera latifi* venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2016 Dec;190:48-53 ([doi: 10.1016/j.cbpc.2016.08.006](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.006)).
5. A.V. Kishmiryan, The development and evaluation of effectiveness of animal derived monovalent antivenom against *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) venom. *Biolog. Journal of Armenia*, 3 (71), pp. 60-66, 2019 (<http://biology.asj-oa.am/11610/1/60.pdf>).
6. 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.
7. G. Kirakosyan, H. Tadevosyan, N. Ghazaryan, A. Kishmiryan, N. Ayvazyan, The effect of *Montivipera raddei* viper venom on human red cell membrane ATPase activities. *FEBS Journal*, 281 (Suppl. 1), p. 643, 2014.
8. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L., Kishmiryan A., Kirakosyan G., Nazaryan O., Ghevondyan T., Zakaryan N., Ayvazyan N.M. (2015), *Macrovipera lebetina obtusa* venom and obtustatin: Their applications in cancer research. The 42nd Congress of International Society of Oncology and BioMarkers “*Oncology in the Biomarker Era: Biology – Diagnostics – Therapy Poland*” ISOBM, Zakopane, Poland, 3-7 october, Tumor Biology, Volume 36, Supplement 1, S 35 (doi.org/10.1007/s13277-015-4009-7).

9. G. Kirakosyan, H. Tadevosyan, N. Zaqaryan, A. Kishmiryan, N. Ayvazyan, Morphological and functional alteration of erythrocyte ghosts caused by vipers venom. 18th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Oxford, UK(Elsevier), 25-30th September 2015, p. 151.

10. Н. М. Айвазян, Н. А. Казарян, Л. А. Гуликян, А. В. Кишмирян, Г. В. Гукасян, Исследование противоопухолевого воздействия дезинтегрина обтустатина из яда закавказской гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*) на мышцах с саркомой Крокера (S-180). “Успехи молекулярной онкологии”, 2016, т. 3, N4, стр. 70.

11. Н.А. Казарян, Л.А. Гуликян, А.В. Кишмирян, Г.Р. Киракосян, О.А. Назарян, Т.А. Гевондян, Н.А. Закарян, Н.М. Айвазян, ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ОБТУСТАТИНА И ЦЕЛЬНОГО ЯДА ЗМЕИ MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA НА МЫШАХ С САРКОМОЙ КРОКЕРА (S-180). V Съезда физиологов СНГ, Сочи, Россия 4–8 октября 2016, стр. 120, ACTA NATURAE, СПЕЦВЫПУСК том 1, 2016

12. Arsen V. Kishmiryan, Lusine A. Ghulikyan, Maryam Mohamadvarzi, Gevorg V. Ghukasyan & Naira M. Ayvazyan. RECOGNITION OF VIPERA LATIFI VENOM COMPONENTS BY THE S-180 SARCOMA DNA AND ITS ANTI-TUMOR ACTIVITY. XLII Brazilian Biophysical Society Congress, October 27th-29th, 2017.

13. D.O.Terzyan, A.V.Kishmiryan, G.V.Ghukasyan, A.V.Meltonyan, N.M.Ayvazyan, L.R.Manvelyan, Neurotoxic effect of *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) and *Montivipera raddei* (MR) snake venoms on rats neuromuscular junction (NMJ). TOXICON Special Issue: EU-IST 2018, Yerevan, Armenia, 22-26 Sep, 2018; Volume 159, Supplement 1, 2019, p. 20.

14. Kishmiryan AV, Terzyan DO, Ghulikyan LA, Ghukasyan GV, Meltonyan AV, Manvelyan LR, Ayvazyan NM, IN VIVO EFFECT OF MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA(MLO) AND MONTIVIPERA RADDEI (MR) SNAKE VENOMS ON RATS NEUROMUSCULAR JUNCTION (NMJ). FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, 10-13 July, 2019, p. 676.

15. N.Ayvazyan, A. Kishmiryan, D. Terzyan, A. Voskanyan, The specificity of Middle East vipers' venom action on the nervous tissue. 20th World Congress of the International Society on Toxinology, Buenos Aires, Argentina, 08-13 Sep, 2019, p. 53.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОТИВОЯДЯ ПРОТИВ ЗМЕИ MACROVIPERA LEBETINA OBTUSA

РЕЗЮМЕ

Впервые в РА был получен моновалентный антитод животного происхождения против яда подвида *Macrovipera lebetina obtusa* путем гипериммунизации подопытных животных малыми, увеличивающимися дозами яда MLO.

Оценка нейтрализующей способности (летального эффекта яда MLO) антитода полученного из сыворотки кролика показала, что при 2LD₅₀ дозе яда проявляется защитный потенциал противоядия. Качественный анализ данного препарата посредством геле-электрофореза показал 73.9%-ое содержание γ -глобулинов. Так, по литературным данным, во время очистки каприловой кислотой выход IgG может составить 60-65%-ов, а чистота более 90%-ов, то есть результаты свидетельствуют об удовлетворительных качественных характеристиках противоядия, которые увеличиваются с увеличением применяемого объема антитода. По результатам теста кросс-реактивности с ядами других змей, было выяснено, что данное противоядие, кроме хорошо выраженной реакции антиген/антитело с ядом MLO, проявляет определенное протекторное действия и против ядов змей *Daboia russelii*, *Montivipera raddei* и *Montivipera latifi*.

Оценка эффективности антитода полученного путем гипериммунизации овна показала, что летальный эффект 5LD₅₀ дозы яда уменьшается обратно пропорционально разведению антитода, и уже при двукратном разведении наблюдается полная нейтрализация летального эффекта яда. Полуэффективная доза противоядия (ED₅₀), то есть объем антитода, который может нейтрализовать 5LD₅₀ дозу яда, составляет **0.05257** мл/мышь или **2.6285** мл/кг, а защитная эффективность (R), то есть количество полулетальных доз яда которые может нейтрализовать 1мл неразведенного антитода, составляет **76**.

Оценка антигеморрагического потенциала противозмеиной сыворотки полученной путем гипериммунизации овна показала полное подавление геморрагического эффекта яда.

Опыты оценки антифосфолипазной и антиказеинолитической активности противоядия показали, что, при использовании неразведенного антитода, PLA₂ яда MLO и казеинолитическая активность, обусловленная металлопротеиназами, подавляются.

Антитод производства UZBIOPHARM-а, который есть в наличии и используется в клиниках РА, показывает более низкую эффективность против летального и геморрагического эффекта яда MLO.

**THE DERIVATION OF IMMUNOLOGICAL ANTIVENOM AGAINST MACROVIPERA
LEBETINA OBTUSA SNAKE VENOM AND EVALUATION OF THE EFFICACY**

SUMMARY

For the first time in Armenia, an animal-derived antivenom against *Macrovipera lebetina obtusa* subspecies has been derived through overimmunisation of the experimental animals by small, increasing dosages of venom.

The monitoring of antivenom derived from rabbits for the neutralization of the MLO venom's deadly effect have shown, that in case of venom 2LD₅₀ dosage antivenom the obvious protection capacity has been observed. The antivenom's qualitative analysis through gel-electrophoresis has shown 73.9% concentration of γ -globulins. According the literature data, during cleansing through capric acid the IgG can be seceded by over 90% purification, with release of 60-65%. Consequently the results are showing the antivenoms satisfactory quantitative properties and also have shown that in parallel with increasing volumes of antivenom, the efficiency of such is increased as well.

Crossreactivity testing of antivenom with other snake species venoms have shown that besides its great result effect of MLO antigen/antibody, the antivenom has some interactions with the venoms of snakes of *Daboia russelii*, *Montivipera raddei* and *Montivipera latifi* species.

The efficiency testing of antivenom derived through ovine overimmunization has shown that deadly effect of 5LD₅₀ dosage of MLO venom is decreasing reverse relatively to the dilution of concentration of antivenom, and, at the case of dilution of antivenom concentration in twice, the full neutralization of deadly effect of the venom is observed, average dosage (ED₅₀) – meaning the volume required for neutralizing the venom dosage of 5LD₅₀ is **0.05257** ml/mouse or **2.6285** ml/kg. The protection efficiency (R), meaning the average deadly dosage of venom neutralizing 1ml of non-diluted antivenom is 76.

Analysis of anti-hemorrhagic ability of antivenom derived from ram has shown obvious suppression of hemorrhagic effect of venom.

The analysis of anti-PLA₂ and anticaseinolytic activity have shown, that in case of use of non-diluted antivenom, the venom's PLA₂ and caseinolytic activity (caused by metalloproteinases) are suppressed.

The antivenom produced by UZBIOPHARM and used in Armenian medical facilities (Serum contra venenum Viperae lebetinae, Echis carinati, Najae oxianae) shows less efficiency against lethal and hemorrhagic effect of MLO venom.