

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ ФОСФОЛИПАЗ A₂ ЯДОВ *GLOYDIUS BLOMHOFFII* И *GLOYDIUS HALYS* НА КОМПОНЕНТЫ ГЕМОСТАЗА *IN VITRO*

М.А. Соловьева^{1*}, Л.В. Галевская¹, М.А. Галкин¹, Г.М. Бердичевский¹,
Е.В. Семенова¹, И.М. Михель², Е.А. Рогожин³, Л.В. Васина¹

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8; *эл. почта: solovyeva_ma@mail.ru

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42

³Государственный научный центр Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Целью данного исследования было изучение воздействия ядов *Gloydius blomhoffii* и *Gloydius halys* и их фракций на тромбоцитарный и плазменный гемостаз, а также оценка возможности ингибитора секреторной фосфолипазы A₂ (сФЛА₂) Varespladib нейтрализовать коагулопатическую активность, обусловленную сФЛА₂ в составе данных ядов. Установлено, что проагрегантное действие на тромбоцитарный гемостаз цельных ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* является результирующей разнонаправленного действия многих белковых компонентов ядов, а содержащие сФЛА₂ фракции оказывали антиагрегантное действие. Цельные яды *G. halys* и *G. blomhoffii* и Varespladib, добавленный к ним, не влияли на внешний путь гемокоагуляции, но тормозили внутренний путь активации свёртывания крови человека. Парадоксальный эффект ещё большего увеличения антикоагулянтной активности ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* ингибитором сФЛА₂ Varespladib может быть следствием усиления взаимодействия сФЛА₂ с фактором Ха каскада гемокоагуляции после образования комплекса фермента с его ингибитором.

Ключевые слова: фосфолипаза A₂; Varespladib; гемостаз; *Gloydius blomhoffii*; *Gloydius halys*

DOI: 10.18097/PBMCR1639

ВВЕДЕНИЕ

В процессе эволюции у ядовитых змей сформировалась способность оказывать на добычу генерализованное воздействие. В распространении яда по всему организму значительная роль принадлежит секреторной фосфолипазе A₂ (сФЛА₂), обладающей антикоагулянтными свойствами [1, 2].

В качестве дополнительного метода лечения змеиных укусов (наряду с введением антисыворотки) рассматривается возможность перорального приёма низкомолекулярного ингибитора сФЛА₂ Varespladib-methyl (Var-m; метил 2-((3-(2-амино-2-оксоацетил)-1-бензил-2-этил-1H-индол-4-ил)окси)ацетат) [3, 4]. Рядом авторов было установлено, что этот препарат способен нейтрализовать антикоагулянтный эффект, обусловленный действием сФЛА₂ яда некоторых гемотоксичных змей [5, 6].

Подобно ядам других гадюковых яды щитомордников *Gloydius blomhoffii* (щитомордник восточный) и *Gloydius halys* (щитомордник обыкновенный) содержат значительное количество фосфолипазы A₂ группы IIА, которую относят к секреторным фосфолипазам (сФЛА₂). В ядах *G. blomhoffii* и *G. halys* содержание сФЛА₂ составляет 62,5% [7] и 14-27% [8] соответственно.

Целью нашей работы было исследование воздействия ядов *G. blomhoffii* и *G. halys* и их фракций на тромбоцитарный и плазменный гемостаз, а также оценка возможности нейтрализовать коагулопатическую активность, обусловленную сФЛА₂ в составе данных ядов.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использовали лиофилизированные образцы яда *G. blomhoffii* и *G. halys*, предоставленные компанией “Сибирский серпентарий” (Россия) на основании договора о научном сотрудничестве; фосфолипиды (Lecithin from egg BioChemica, “AppliChem”, Германия); наборы реагентов для определения ADP-агрегации тромбоцитов (ADP), активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ-ТЕСТ) и протромбинового времени (ТЕХПЛАСТИН-ТЕСТ) (“Технология-Стандарт”, Россия). Яд растворяли в фосфатно-солевом буфере (“diaGene”, Россия), pH 7,4, до 10 мг/мл; Varespladib (LY315920), (“Sigma-Aldrich”, США). Var растворяли в 10% ДМСО (диметилсульфоксид), (“ПанЭко”, Россия), исходная концентрация составила 13,1 мМ.



Фракционирование змеиного яда

Перед фракционированием яды предварительно растворяли в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) (“Sigma-Aldrich”) и анализировали методом аналитической обращённо-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) в градиенте 25–40% ацетонитрила (“Panreac”, Испания) на колонке XBRIDGE C₁₈ VEN 130 Анг 5 мкм (“Waters”, Ирландия). Для аналитической ОФ-ВЭЖХ использовали систему Agilent 1200 Series (“Agilent Technologies”, США), для полупрепаративной — Gilson 302/303 PUMP (“Gilson”, Франция). Для аналитической ОФ-ВЭЖХ использовали УФ-детекцию при 214 нм, для полупрепаративной — 280 нм. В первом случае нагрузка составляла 1,0–1,5 мг, во втором — 3,0–4,0 мг. Полученные фракции были подупарены (вакуумный концентратор SpeedVac, “Labconco”, США), лиофилизированы (лиофильная сушка FreeZone, “Labconco”) и хранились при температуре -80°C до использования.

Определение первичной структуры белков из ядов G. blomhoffii и G. halys

Первичную структуру белков из ядов определяли методом автоматической ступенчатой деградации по Эдману с использованием секвенатора белков и пептидов PPSQ-33A (“Shimadzu Corp.”, Япония) согласно протоколу фирмы-производителя. Для анализа брали 800 пмоль белка, очищенного методом аналитической ОФ-ВЭЖХ, и растворяли в 30 мкл 50% водного ацетонитрила с добавлением 0,1% ТФУ. Идентификацию фенилтиогидантоиновых производных аминокислот проводили с использованием программного обеспечения LabSolution (“Shimadzu Corp.”).

Анализ активности фосфолипазы A₂

Активность фосфолипазы A₂ определяли по выделению протонов в среде с рН индикатором феноловым красным (ΔA₅₅₇) в течение 2 мин с начала регистрации при 37°C. Реакцию начинали внесением 0,5 мкг змеиного яда в пробу. Объём пробы составлял 1,8 мл. Среда для измерения активности содержала следующие компоненты (конечные концентрации): 5 мМ NEPES (“Servicebio”, Китай), рН 7,8, 88 мкМ феноловый красный (“Вектон”, Россия), 150 мМ NaCl (“Тротекс”, Россия), 9 мМ CaCl₂ (“CDH”, Индия), 3,1 мМ фосфатидилхолин яичного желтка (Lecithin from egg BioChemica, “AppliChem”), 6,14 мМ тритон X-100 (“CDH”). Активность фосфолипазы A₂ определяли на спектрофотометре BioRadxMarx (“Bio-Rad Laboratories”, США). Исследования проводили в 5 повторах.

Исследование влияния цельного яда и отдельных фракций на показатели тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза

Пробоподготовка. Кровь для исследования только определяемых в работе параметров получена в отделении переливания крови Первого

Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. Для предотвращения активации тромбоцитов кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие 3,8% цитрата натрия в качестве стабилизатора в соотношении цитрат натрия : кровь — 1:9. Стабилизированную кровь для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP, Platelet Rich Plasma) центрифугировали 7 мин при комнатной температуре и 150 g. Часть PRP отбирали в пластиковую пробирку в количестве, необходимом для выполнения анализа. Из оставшейся крови получали бедную тромбоцитами плазму с помощью центрифугирования в течение 30 мин при 2500 g для калибровки шкалы оптической плотности агрегометра и для исследования влияния ядов на плазменный гемостаз.

Агрегация тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов в PRP изучали с помощью агрегометра Solar AP 2110 (“Solar”, Беларусь) при 37°C и скорости вращения магнитной мешалки 1200 об/мин. Влияние яда и отдельных фракций на агрегацию тромбоцитов оценивали по реакции с добавлением к плазме индуктора 10 мкМ ADP. Яд и лиофилизированные фракции предварительно растворяли в физиологическом растворе (1 мкг в 1 мл). Ход исследования: в кюветках последовательно смешивали 270 мкл PRP и 30 мкл соответствующих растворов, смесь инкубировали 5 мин при 37°C, после чего вносили 10 мкл ADP. В контроле к 270 мкл PRP добавляли 30 мкл физиологического раствора. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато.

Плазменный гемостаз. Влияние яда и его фракций на плазменное звено гемостаза оценивали по способности удлинять или сокращать время свёртывания бедной тромбоцитами плазмы (по сравнению с контролем) при добавлении в плазму в тестах активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) и протромбинового времени (ПВ). Исследования проводили на коагулометре АПГ2-02-П (“ЭКМО”, Россия). Ход исследования: смешивали 50 мкл плазмы, 40 мкл растворов ядов и фракций и 10 мкл физиологического раствора. Далее смесь инкубировали при 37°C в течение 60 с и в соответствии с протоколом исследования определяли время коагуляции на анализаторе. В контроле в плазму добавляли 50 мкл физиологического раствора. Для оценки влияния Var на свёртывающую систему крови *in vitro* смешивали 40 мкл физиологического раствора, 10 мкМ Var и 50 мкл плазмы. Для определения вклада сФЛА₂, обладающей ферментативной активностью, в составе цельного яда *G. blomhoffii* и *G. halys*, смешивали 40 мкл яда и 10 мкМ Var, инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем вносили 50 мкл плазмы. Измерения проводили в 7 повторах.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism (США). Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего (M±SEM).

Статистическую оценку результатов проводили путём сравнения показателей в опытной и контрольной группах. Сравнение между группами проводили по критерию Манна-Уитни. Критический уровень значимости различий принимали равным 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности сФЛА₂

Ферментативная активность сФЛА₂ ядов *G. blomhoffii* и *G. halys* была довольно высокой и составляла 26,5±2,64 ед/мг и 30,6±3,98 ед/мг яда соответственно. Статистически значимых различий в активности сФЛА₂ двух исследованных видов щитомордника не выявлено.

Фракционирование змеиного яда

В результате фракционирования ядов с помощью ОФ-ВЭЖХ были получены 23 фракции яда *G. blomhoffii* и 26 фракций яда *G. halys*.

Диапазон молекулярных масс изучаемых фракций после разделения цельных ядов щитомордников *G. blomhoffii* и *G. halys* методом аналитической обращённо-фазовой ВЭЖХ, по данным MALDI-TOF MS, составил 2,8–13,6 кДа, из которых наиболее низкомолекулярные пептиды — это нейротоксины, а наиболее высокомолекулярные — различные изоформы ФЛА₂.

Определение первичной структуры белков из ядов *G. blomhoffii* и *G. halys*

Методом автоматической деградации по Эдману анализировали белковые фракции ядов *G. blomhoffii* и *G. halys* (**16** фракцию *G. blomhoffii* и **22** фракцию *G. halys*). Поиск гомологий первичных структур с применением алгоритма BLASTP позволил идентифицировать оба этих белковых компонента как acidic phospholipase A₂ (PA2-II), или phosphatidylcholine 2-acylhydrolase (UniProt ID: P20249.1).

Агрегация тромбоцитов. В таблице 1 представлены наши данные о влиянии ядов *G. blomhoffii* и *G. halys*, а также их фракций на тромбоцитарный гемостаз в тесте ADP-индуцированной агрегации.

Как видно из представленных данных, цельные яды *G. halys* и *G. blomhoffii* обладали проагрегантными свойствами. Усиление агрегации тромбоцитов было отмечено при воздействии десяти фракций яда *G. halys* с наиболее выраженным эффектом для фракций **6**, **7** и **9**, и пяти фракций яда *G. blomhoffii* с наиболее выраженным эффектом для фракции **4**. Антиагрегантное действие демонстрировали тринадцать фракций *G. halys* с наиболее выраженным эффектом для фракций **16** и **17** и одиннадцать фракций *G. blomhoffii* с наиболее выраженным эффектом для фракций **9**, **10** и **11**.

Таким образом, воздействие на тромбоцитарный гемостаз цельного яда обоих видов щитомордника является результирующей противоположно направленного действия многих белковых

Таблица 1. Влияние цельного яда и фракций *G. halys* и *G. blomhoffii* на ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека (n = 7)

ADP-индуцированная агрегация тромбоцитов		
Субстанция	Яд и фракции <i>G. halys</i>	Яд и фракции <i>G. blomhoffii</i>
Показатель	Амплитуда, %	
Контроль	80,7±1,45	68,5±1,39
Цельный яд	52,7±2,14*	39,7±1,56*
Фракции		
1	100,4±1,12*	67,3±1,19
2	101,6±0,98*	50,1±0,77*
3	92,8±1,54*	63,8±1,43*
4	16,9±0,77*	сгусток
5	72,6±2,11*	84,2±1,15*
6	сгусток	94,4±2,01*
7	сгусток	81,3±2,13*
8	40,3±1,02*	33,9±1,59*
9	сгусток	>100
10	100,5±2,23*	>100
11	88,1±0,98*	>100
12	80,5±1,32	65,5±1,28
13	33,5±1,52*	64,9±1,87
14	83,0±2,41	80,0±2,15*
15	92,6±0,87*	67,6±1,89
16	>100	75,3±1,76*
17	>100	75,8±1,22*
18	56,9±0,43*	70,9±1,33
19	48,3±1,54*	97,8±1,76*
20	82,5±1,98	71,4±1,55
21	99,8±0,87*	76,7±0,99*
22	94,5±0,94*	52,5±1,88*
23	107,6±1,23*	70,1±1,51
24	73,9±2,19*	—
25	99,3±0,89*	—
26	90,0±0,73*	—

Примечание. Результаты для фракций, содержащих сФЛА₂, выделены жирным курсивом; * – различия статистически значимо выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$); • – различия статистически значимо ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ ФЛА₂ ЯДОВ *GLOYDIUS* НА ГЕМОСТАЗ

компонентов ядов. сФЛА₂-содержащие фракции **22** *G. halys* и **16** *G. blomhoffii* продемонстрировали умеренный антиагрегантный эффект.

Плазменный гемостаз. Результаты исследования фракций ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* на плазменный гемостаз в тесте АПТВ приведены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, цельные яды *G. halys* и *G. blomhoffii* проявляли антикоагулянтное действие, статистически значимое по сравнению с контролем ($p < 0,05$), удлиняя время образования сгустка в тесте АПТВ. У большинства (19 из 26) фракций яда *G. halys*, так же, как и в цельном яде, наблюдалось выраженное в разной степени антикоагулянтное действие. Наиболее сильно тормозили плазменный гемостаз по внутреннему пути компоненты фракции **18**. Прокоагулянтный эффект обнаружен только у четырёх фракций яда *G. halys* с максимальным (необратимым) эффектом для фракций **16** и **17**. сФЛА₂-содержащая **22** фракция яда *G. halys*, хотя и в слабой степени, также проявила прокоагулянтный эффект (рис. 1).

Поскольку для большинства сФЛА₂ гадюковых характерно торможение свёртывания крови по внутреннему механизму [2, 9], можно предположить, что противоположное действие сФЛА₂ яда *G. halys* связано с наличием в содержащей её фракции примеси какого-либо прокоагулянта, возможно, из числа сериновых протеиназ [10–12]. В пользу этого предположения свидетельствует отмеченное Zhong и соавт. [13] антикоагулянтное действие рекомбинантной высокоочищенной сФЛА₂ яда этого щитомордника, связанное с её каталитической активностью.

Как цельный яд, так и большинство фракций (11 из 23) *G. blomhoffii* проявляли антикоагулянтное действие с максимальным эффектом для фракций **8** и **12**. Прокоагулянтный необратимый эффект был отмечен только у четырёх фракций (**1**, **9**, **10** и **11**). Фракция, содержащая сФЛА₂ (фракция **16**), проявляла антикоагулянтное действие. Увеличение времени коагуляции в присутствии этой фракции было примерно полуторакратным.

Обнаруженное у ряда сФЛА₂ змеиных ядов антикоагулянтное действие обусловлено ингибированием протромбиназного комплекса в результате их связывания с фактором Ха, как компонента этого комплекса [14]. Из ядов двенадцати гадюковых (*Viperidae*), согласно данным Faugé и соавт. [15], наиболее сильным антикоагулянтным действием обладала щелочная каталитически активная изоформа сФЛА₂ из яда гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus*. Var, по данным этих авторов, тормозил антикоагулянтную активность компонентов исследованных ядов змей [16], что подтверждает вклад в антикоагулянтное действие их фосфолипазной активности. Поэтому представлялось целесообразным оценить влияние Var на сФЛА₂-опосредованное антикоагулянтное действие цельных ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* в тестах АПТВ и ПВ.

Таблица 2. Влияние цельного яда и фракций *G. halys* и *G. blomhoffii* на плазменный гемостаз в тесте АПТВ (n = 7)

АПТВ, с		
Субстанция	Яд и фракции <i>G. halys</i>	Яд и фракции <i>G. blomhoffii</i>
Контроль	38,4±0,84	37,5±0,99
Цельный яд	47,5±0,51*	46,6±0,27*
Фракции		
1	41,6±0,49*	27,3±1,22*
2	43,0±1,12*	40,5±1,34
3	40,3±0,89	41,1±1,77
4	49,4±0,97*	40,4±0,86
5	45,3±1,03*	41,5±1,29
6	51,0±0,63*	73,5±1,68*
7	41,7±1,02*	127,5±2,32*
8	40,8±1,11	>200
9	45,3±0,91*	сгусток
10	44,5±0,88*	сгусток
11	45,6±2,01*	сгусток
12	110,3±2,45*	>200
13	76,6±1,43*	74,4±1,59*
14	44,4±0,99*	45,5±0,87*
15	41,7±0,78*	49,1±1,76*
16	сгусток	57,2±1,89*
17	сгусток	48,4±1,33*
18	>400	52,8±1,81*
19	64,6±1,14*	48,6±1,55*
20	43,9±0,98*	36,9±0,74
21	71,1±1,01*	39,8±1,46
22	19,9±1,21*	40,0±1,33
23	31,6±0,87*	38,8±2,08
24	71,7±0,98*	—
25	46,3±1,54*	—
26	40,9±0,76	—

Примечание. Результаты для фракций, содержащих сФЛА₂, выделены жирным курсивом; * – различия статистически значимо выше по сравнению с контролем ($p < 0,05$); • – различия статистически значимо ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

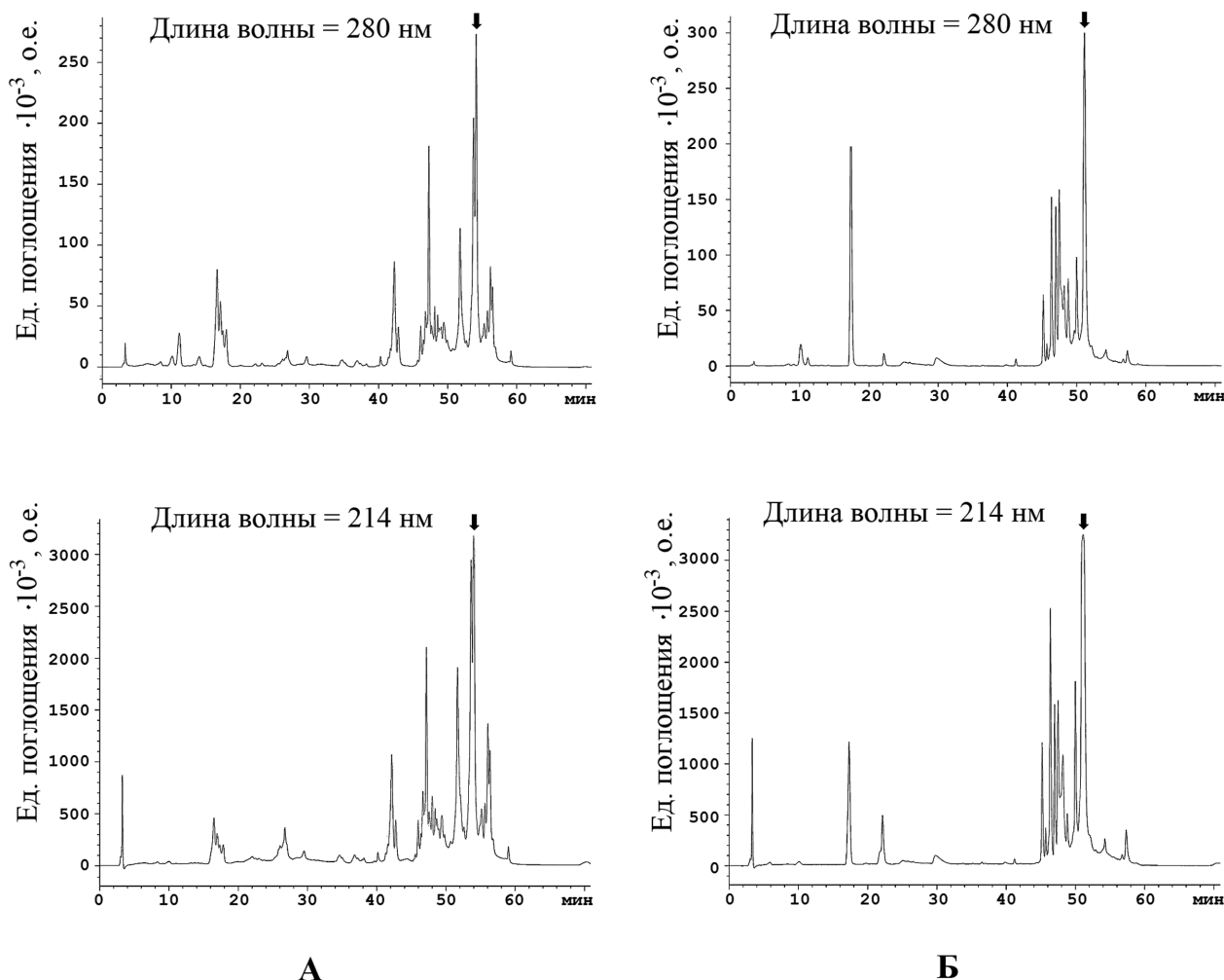


Рисунок 1. Обращённо-фазовая хроматография яда *G. halys* (А) и *G. blomhoffii* (Б) с детектированием поглощения при 214 нм (нижний ряд) и 280 нм (верхний ряд). Целевая фракция, соответствующая сФЛА₂, отмечена чёрной стрелкой

В таблице 3 представлены данные о влиянии цельных ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* на показатели плазменного гемостаза без добавления ингибитора сФЛА₂ Var и в его присутствии.

Как видно из таблицы 3, Var в сочетании с ядом как *G. halys*, так и *G. blomhoffii*, усиливал торможение внутреннего пути свёртывания крови человека, удлиняя время образования сгустка в тесте АПТВ ($p < 0,05$). Обнаруженный нами парадоксальный эффект ещё большего увеличения антикоагулянтной активности ядов, наиболее выраженный у *G. blomhoffii* по сравнению с *G. halys* ($p < 0,05$) при добавлении к ним ингибитора сФЛА₂ Var может быть следствием усиления взаимодействия сФЛА₂ с фактором Ха каскада гемокоагуляции после образования комплекса фермента с его ингибитором. В литературе имеются сведения о возможности проявления биологических эффектов неактивных сФЛА₂ яда змей за счёт белок-белкового взаимодействия [17]. В тесте ПВ Var в сочетании с ядом как *G. halys*, так и *G. blomhoffii*, не оказывал влияния на внешний путь свёртывания крови человека.

Таблица 3. Влияние цельных ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* на показатели плазменного гемостаза в тестах АПТВ и ПВ без добавления ингибитора сФЛА₂ Var и в его присутствии

АПТВ, с		
Субстанции	<i>G. halys</i>	<i>G. blomhoffii</i>
Цельный яд	47,9±1,99	47,6±1,46
Var	46,8±1,54	47,0±1,03
Цельный яд +Var	54,3±2,24*	69,7±1,83*^
ПВ, с		
Цельный яд	14,5±1,28	13,9±1,55
Var	13,7±2,10	13,1±0,89
Цельный яд +Var	12,6±1,12	13,4±1,11

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с цельным ядом, $p < 0,05$; ^ – различия статистически значимы между пробами с цельным ядом и Var, $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследование влияния ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* и их белковых фракций на ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека выявило проагрегантное действие цельных ядов и антиагрегантное действие фракций, содержащих сФЛА₂.

2. Цельные яды *G. halys* и *G. blomhoffii* тормозили внутренний путь активации свёртывания крови человека в тесте АПТВ. Парадоксальный эффект ещё большего увеличения антикоагулянтной активности ядов *G. halys* и *G. blomhoffii* ингибитором сФЛА₂ Varespladib может быть следствием усиления взаимодействия сФЛА₂ с фактором Ха каскада гемокоагуляции после образования комплекса фермента с его ингибитором.

3. Цельные яды *G. halys* и *G. blomhoffii*, а также ингибитор сФЛА₂ Varespladib в составе яда, не влияли на внешний путь гемокоагуляции плазмы крови человека в тесте ПВ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено на заседании Локального этического комитета Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова МЗ РФ (протокол № 307 от 20 октября 2025 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oliveira A.L., Viegas M.F., da Silva S.L., Soares A.M., Ramos M.J., Fernandes P.A. (2022) The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat. Rev. Chem.*, **6**(7), 451–469. DOI: 10.1038/s41570-022-00393-7

2. Hiu J.J., Yap M.K.K. (2020) Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. *Biochem. Soc. Trans.*, **48**(2), 719–731. DOI: 10.1042/BST20200110

3. Bulfone T.C., Samuel S.P., Bickler P.E., Lewin M.R. (2018) Developing small molecule therapeutics for the initial and adjunctive treatment of snakebite. *J. Trop. Med.*, **2018**, 4320175. DOI: 10.1155/2018/4320175

4. Gerardo C.J., Carter R.W., Kumar S., Shirazi F.M., Kotehal S.D., Akpunonu P.D., Bhalla A., Schwartz R.B., Bammigatti C., Manikath N., Mukherjee P.P., Arnold T.C., Wolk B.J., Sheikh S.S., Sollee D.R., Vearrier D.J., Francis S.J., Aizenberg A., Kumar H., Ravikumar M.K., Sarkar S., Haston T., Micciche A., Oomman S.C., Owen J.L., Ritter B.A., Samuel S.P., Lewin M.R., Platts-Mills T.F. (2024) Oral varespladib for the treatment of snakebite envenoming

in India and the USA (BRAVO): a phase II randomised clinical trial. *BMJ Glob. Health*, **9**(10), e015985. DOI: 10.1136/bmjgh-2024-015985

5. Xie C., Albulescu L-O., Still K.B.M., Slagboom J., Zhao Y., Jiang Z., Somsen G., Vonk F., Casewell N., Kool J. (2020) Varespladib inhibits the phospholipase A₂ and coagulopathic activities of venom components from hemotoxic snakes. *Biomedicines*, **8**(6), 165. DOI: 10.3390/biomedicines8060165

6. Kazandjian T.D., Arrahman A., Still K.B.M., Somsen G.W., Vonk F.J., Casewell N.R., Wilkinson M., Kool J. (2021) Anticoagulant activity of *Naja nigricollis* venom is mediated by phospholipase A₂ toxins and inhibited by varespladib. *Toxins (Basel)*, **13**(5), 302. DOI: 10.3390/toxins13050302

7. Ha S.-J., Choi Y.-O., Kwag E.-B., Kim S.-D., Yoo H.-S., Kang I.-C., Park S.-J. (2022) Qualitative analysis of proteins in two snake venoms, *Gloydius blomhoffii* and *Agkistrodon acutus*. *J. Pharmacopuncture*, **25**(1), 52–62. DOI: 10.3831/KPI.2022.25.1.52

8. Li S., Wang J., Zhang X., Ren Y., Wang N., Zhao K., Chen X., Zhao C., Li X., Shao J., Yin J., West M.B., Xu N., Liu S. (2004) Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem. J.*, **384**(Pt 1), 119–127. DOI: 10.1042/BJ20040354

9. Kini R.M. (2005) Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. *Toxicon*, **45**(8), 1147–1161. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.018

10. Ullah A., Masood R., Ali I., Ullah K., Ali H., Akbar H., Betzel C. (2018) Thrombin-like enzymes from snake venom: structural characterization and mechanism of action. *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**, 788–811. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.164

11. Castro H.C., Zingali R.B., Albuquerque M.G., Pujol-Luz M., Rodrigues C.R. (2004) Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**(7–8), 843–856. DOI: 10.1007/s00018-003-3325-z

12. Zeng F., Shen B., Zhu Z., Zhang P., Ji Y., Niu L., Li X., Teng M. (2013) Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. *Arch. Toxicol.*, **87**(3), 535–545. DOI: 10.1007/s00204-012-0957-5

13. Zhong X., Liu J., Wu X., Zhou Y. (2001) Expression, purification and biochemical characterization of a recombinant phospholipase A₂ with anticoagulant activity from *Agkistrodon halys* Pallas. *J. Nat. Toxins*, **10**(1), 17–25.

14. Faure G., Gowda V.T., Maroun R.C. (2007) Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on *Viperidae* snake venom phospholipases A₂ by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC Struct. Biol.*, **7**, 82. DOI: 10.1186/1472-6807-7-82

15. Faure G., Saul F. (2011) Structural and functional characterization of anticoagulant, FXa-binding *Viperidae* snake venom phospholipases A₂. *Acta Chimica Slovenica*, **58**(4), 671–677.

16. Youngman N.J., Walker A., Naude A., Coster K., Sundman E., Fry B.G. (2020) Varespladib (LY315920) neutralises phospholipase A₂ mediated prothrombinase-inhibition induced by *Bitis* snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **236**, 108818. DOI: 10.1016/j.cbpc.2020.108818

17. Ivanušec A., Šribar J., Križaj I. (2022) Secreted phospholipases A₂ — not just enzymes: revisited. *Int. J. Biol. Sci.*, **18**(2), 873–888. DOI: 10.7150/ijbs.68093

Поступила в редакцию: 01.12.2025.
 После доработки: 11.02.2026.
 Принята к печати: 11.02.2026.

**THE EFFECT OF THE SECRETORY PHOSPHOLIPASES A₂ FROM *GLOYDIUS BLOMHOFFII*
AND *GLOYDIUS HALYS* VENOMS ON HEMOSTASIS COMPONENTS *IN VITRO***

M.A. Solovyeva^{1*}, *L.V. Galebskaya*¹, *M.A. Galkin*¹, *G.M. Berdichevskiy*¹,
*E.V. Semenova*¹, *I.M. Mikhef*¹, *E.A. Rogozhin*³, *L.V. Vasina*¹

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
6-8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022 Russia; *e-mail: solovyeva_ma@mail.ru

²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiryazevskaya str., Moscow, 127550 Russia

³Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997 Russia

The aim of this study was to investigate the effects of *Gloydius blomhoffii* and *Gloydius halys* venoms and their fractions on platelet and plasma hemostasis, and to evaluate the ability of the secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) inhibitor Varespladib to neutralize the coagulopathic activity mediated by sPLA₂ present in these venoms. The proaggregatory effect of whole *G. halys* and *G. blomhoffii* venoms on platelet hemostasis was associated with multidirectional effects of their multiple protein components, while sPLA₂-containing fractions exhibited an antiaggregatory effect. Whole *G. halys* and *G. blomhoffii* venoms and Varespladib added to them did not affect the extrinsic pathway of hemocoagulation, but inhibited the intrinsic pathway of human blood coagulation. The paradoxical effect of further enhancing the anticoagulant activity of *G. halys* and *G. blomhoffii* venoms with the sPLA₂ inhibitor Varespladib could be determined by a stronger sPLA₂ interaction with blood coagulation factor Xa after formation of the enzyme-inhibitor complex.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: secretory phospholipase A₂; hemostasis; Varespladib; *Gloydius blomhoffii*; *Gloydius halys*

Funding. The study was performed without external funding.

Received: 01.12.2025; revised: 11.02.2026; accepted: 11.02.2026.