

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ СЛИЗИ КОЖИ РЫБ, ОБЛАДАЮЩИХ ТРОМБОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Л.Л. Фомина¹, Ю.Л. Ошуркова¹, О.А. Жунина², кандидаты биологических наук,
Т.С. Кулакова¹, кандидат сельскохозяйственных наук,
А.Э. Вайцель¹, аспирант

¹Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Верещагина,
160555, Вологда, с. Молочное, ул. Шмидта, 2
E-mail: yul.oshurkova@yandex.ru

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения
117149, Москва, Симферопольский бул., 8
E-mail: olga_yarova@bk.ru

*Одним из перспективных направлений в современной фармакологии является создание биологически активных препаратов на основе веществ природного происхождения. Особый интерес в этом плане представляют пептиды слизи кожи рыб. Цель работы заключалась в очистке и выделении фракции белков – тромбoplastина (фактор свертывания III, тканевой фактор, TF) и протромбoplastина (фактор свертывания XI, F11) из слизи кожи рыб с помощью аффинной и ионообменной хроматографии, а также масс-спектрометрии. В качестве материала для исследования использовали слизь двух видов рыб: африканского клариевого сома (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) и карпа (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758). Среди идентифицированных белков не удалось обнаружить белки, имеющие аналогичные либо высоко гомологичные аминокислотные последовательности с тромбoplastином и протромбoplastином человека. Однако, учитывая способность слизи кожи рыб стимулировать коагуляцию, а также способность отдельных фракций взаимодействовать с антителами к тромбoplastину и протромбoplastину, можно утверждать, что идентифицированные белки имеют эпитопы, гомологичные по функциям тромбoplastину или протромбoplastину, благодаря которым компоненты слизи кожи рыб способны уменьшать время коагуляции.*

STUDY OF PROTEIN COMPONENTS OF FISH SKIN MUCUS WITH THROMBOGENIC ACTIVITY

Fomina L.L.¹, Oshurkova Yu.L.¹, Junina O.A.², Kulakova T.S.¹, Weitzel A.E.¹

¹Vologda State Dairy Farming Academy by N.V. Vereshchagin,
160555, Vologda, s. Molochnoe, ul. Shmidta, 2
E-mail: yul.oshurkova@yandex.ru

²Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy,
117149, Moscow, Simferopolskiy bul., 8
E-mail: olga_yarova@bk.ru

*One of the promising directions in modern pharmacology is the creation of biologically active drugs based on substances of natural origin. Of particular interest in this regard are peptides of fish skin mucus. The aim of the work was to purify and isolate the protein fractions – thromboplastin (clotting factor III, tissue factor, TF) and prothromboplastin (clotting factor XI, F11) from fish skin mucus using affine and ion exchange chromatography, as well as mass spectrometry. The slime of two fish species was used as the material for the study: the African clarias catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) and the carp (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758). Among the identified proteins, it was not possible to find proteins that have similar or highly homologous amino acid sequences with human thromboplastin and prothromboplastin. However, given the ability of fish skin mucus to stimulate coagulation, as well as the ability of individual fractions to interact with antibodies to thromboplastin and prothromboplastin, it can be argued that the identified proteins have epitopes that are homologous in function to thromboplastin or prothromboplastin, thanks to which components of fish skin mucus can reduce the time of coagulation.*

Ключевые слова: рыбы, слизь, тромбогенная активность, белки коагуляции, тромбoplastин, протромбoplastин

Key words: fish, mucus, thrombogenic activity, coagulation proteins, thromboplastin, prothromboplastin

Одним из перспективных направлений в современной фармакологии является создание биологически активных препаратов на основе веществ природного происхождения. Считается, что такие препараты могут обладать высокой биологической активностью, менее выраженным побочным действием и высокой доступностью. Ведется активный поиск новых источников природных пептидов и разрабатываются новые методы их синтеза для дальнейшего введения белковых препаратов в производство. В связи с этим, активно ведется работа по выделению биологически активных пептидов из природных источников [1-3].

Сейчас для фармакологической промышленности особый интерес представляют пептиды рыб [2, 4-10, 15]. Для получения пептидов используются не только ткани рыб, но и любые рыбные отходы, остающиеся после их переработки, а это примерно 20-50% от всего

сырья. Их использование для нужд фармацевтических фабрик может стать решением экономических и экологических проблем утилизации отходов [7]. Наибольший интерес в этом плане представляет слизь кожи рыб и содержащиеся в ней, как предполагается, тромбoplastина и кинины, обеспечивающие высокую скорость свертывания крови при травмировании рыбы [11-13]. В этой связи, описанные пептиды могут представлять собой перспективную группу потенциальных фармакологических препаратов для остановки и профилактики кровотечений.

Цель работы заключалась в очистке и выделении фракции белков – тромбoplastина (фактор свертывания III, тканевой фактор, TF) и протромбoplastина (фактор свертывания XI, F11) из слизи кожи рыб с помощью аффинной и ионообменной хроматографии, а также масс-спектрометрии.

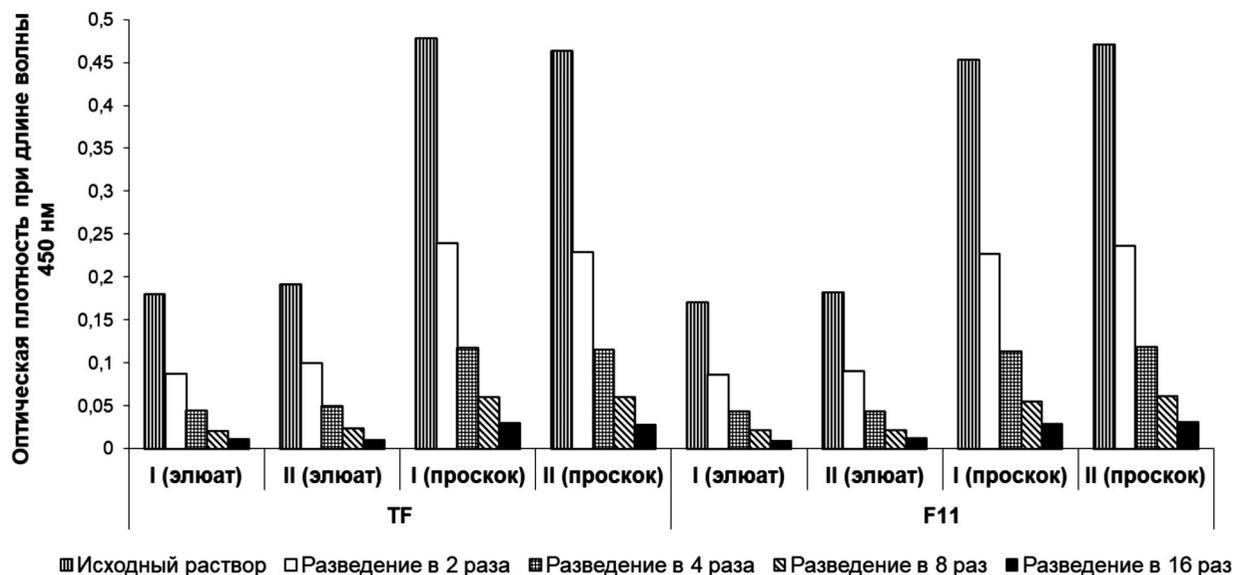


Рис. 1. Результаты непрямого ИФА образцов слизи кожи рыб после аффинной очистки.

Методика. В качестве материала для исследования использовали слизь двух видов рыб: африканского клариевого сома (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822), выращенного в промышленных условиях в УЗВ, расположенной в АкваБиоЦентре ФГБОУ ВО Вологодская ГМХА (n=5), и карпа (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758), выращенного в промышленных условиях в рыбноводческом хозяйстве ООО РТФ «Диана» Кадуйского района Вологодской области (n=5). Выбор данных видов рыб обусловлен результатами предыдущих исследований [11].

Слизь получали по методике Шульцга с соавторами [14]: образцы пробы 1 – слизь сома, образцы пробы 2 – слизь карпа (по 5 фракций каждой пробы).

Определение концентрации общего белка в опытных образцах слизи проводили по Смиуту (с применением бицинониновой кислоты (BCA)). Для этих целей использовался коммерческий набор BCA Protein Assay («Thermo Fisher Scientific», США).

Очистку искомым белков (TF и F11) проводили с помощью как аффинной, так и ионообменной хроматографии (УФ-детектор BioRad Econo UV monitor, США; самописец Jasco, США). Для аффинной хроматографии были приготовлены аффинные смолы (аффинный носитель – CNBr-Sepharose) с иммобилизованными на них коммерческими поликлональными кроличьими антителами АТ (Cloud-Clone Corp.) к TF и F11. Для проведения катионообменной хроматографии использовали CM sephadex, для анионообменной – DEAE sephadex, для аффинной – Непарин sepharose. Для диализа образцов слизи кожи рыб перед аффинной хроматографией был использован 1×PBS (однократный фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4). Перед проведением ионообменной хроматографии образцы слизи кожи рыб были подвергнуты диализу против деионизованной воды.

Качественную оценку осуществляли методами электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях, а также непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого в иммунологический 96-луночный планшет (MaxiSorp, NUNC, Дания) во все лунки были внесены полученные в результате аффинной хроматографии элюаты и «проскоки» в 100 мкл фосфатно-солевого буфера. Далее они титровались шагом в 2 раза. После чего была проведена инкубация при +37 °C в течение 1 ч.

Затем лунки были отмыты фосфатно-солевым буфером. Во все лунки были внесены по 100 мкл АТ, предварительно разведенных до концентрации ~1,5 мкг/мл в 2%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) с добавленным Tween-20. После чего была проведена инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере (300 об/мин). Затем лунки были промыты фосфатно-солевым буфером. Далее в каждую лунку было внесено по 100 мкл антивидовых антител (анти-кроличьих), конъюгированных с пероксидазой хрена HRP (в растворе 2%-ного БСА с Tween-20 (конъюгат предварительно был разведен в 100 раз)). После чего была проведена инкубация в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере (300 об/мин). Далее планшет был промыт фосфатно-солевым буфером. Затем в каждую лунку были добавлены 100 мкл коммерчески доступного раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) с перекисью водорода. Ферментативная реакция проводилась при комнатной температуре в течение 15 мин. Для остановки реакции было добавлено 100 мкл 25%-ной серной кислоты. Измерения оптической плотности были проведены на планшетном спектрофотометре («Labsystems», Финляндия) при длине волны $\lambda = 450$ нм.

Масс-спектрометрия проводилась с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра с лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF/TOF и последующего анализа профиля пептидной фрагментации целевого белка в базе данных MASCOT.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Вологодской области в рамках научного проекта № 18-44-350002.

Результаты и обсуждение. Для определения концентрации общего белка по Смиуту в образцах слизи была построена калибровочная кривая с использованием растворов с известной концентрацией бычьего сывороточного альбумина, и было установлено, что содержание общего белка в образцах слизи находилось в диапазоне от 18 до 20 мг/мл.

Очистка образцов слизи обоих видов рыб осуществлялась на приготовленных аффинных смолах; в результате чего были получены элюаты и «проскоки». Для контроля результатов аффинной хроматографии был проведен непрямо ИФА (рис. 1).

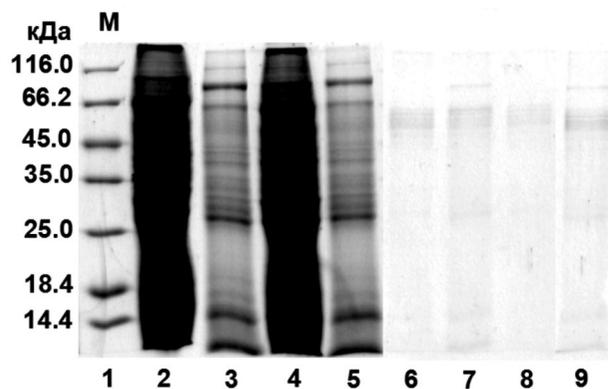


Рис. 2. Электрофореграмма образцов слизи кожи рыб после аффинной очистки: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – «проскок» слизи кожи сома с АТ к ТF; 3 – «проскок» слизи кожи карпа с АТ к ТF; 4 – «проскок» слизи кожи сома с АТ к F11; 5 – «проскок» слизи кожи карпа с АТ к F11; 6 – элюат слизи кожи сома с АТ к ТF; 7 – элюат слизи кожи карпа с АТ к ТF; 8 – элюат слизи кожи сома с АТ к F11; 9 – элюат слизи кожи карпа с АТ к F11.

Как видно из полученных значений оптических плотностей (OD), искомые белки детектировались как в элюатах, так и в «проскоках» образцов обоих видов рыб. Рассчитать концентрацию искомых белков используемым методом ИФА не представляется возможным, так как нет стандартов этих белков, на основе которых строится калибровочная кривая. Таким образом, использование для подтверждения информации об уровнях концентрации искомых белков литературных данных и/или статистических сведений невозможно ввиду их отсутствия. Однако максимальные значения OD даже в исходных растворах, которые не подвергались разведениям, были менее 0,5, что может говорить о невысокой концентрации ТF и F11. Таким образом, можно сделать вывод, что в «проскоках» концентрация белков была значительно больше, что указывает на неполное связывание искомых белков с антителами (АТ), иммобилизованными на аффинных носителях.

Полученные результаты в непрямом неконкурентном ИФА являются качественными. Можно предположить, что о невысокой концентрации искомых белков говорят невысокие значения оптической плотности (менее 0,5 о.е.). Подтверждением этому выводу является проведенный электрофорез в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2).

Из литературных данных известно, что искомые белки – ТF (тромбопластин) и F11 (протромбопластин) имеют молекулярные массы 33 и 29 кДа, соответственно. На электрофореграмме имеются полосы, находящиеся в диапазоне 25–35 кДа, которые, вероятно, соответствуют искомым в образцах белкам. Следует отметить, что во всех «проскоках» (за исключением №№ 2 и 4, так как из-за избыточного количества белков дорожки перегружены, что затрудняет идентификацию) полосы в этом диапазоне окрашены более интенсивно, по сравнению с элюатами, что может указывать на незначительное содержание искомых белков в последних.

Перед проведением ионообменной хроматографии было установлено, что общая концентрация белка до и после проведенного диализа значительно не менялась, что было подтверждено с помощью ВСА-анализа. Образец 2 содержал значительно меньшее количество бел-

ка в сравнении с образцом 1, что также было подтверждено с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Согласно приведенным в литературе данным, слизь кожи рыб содержит факторы, способствующие свертыванию крови, в том числе предполагается наличие белков, гомологичных по структуре или функциям тромбопластину и протромбопластину [11–13], который при анализе методом электрофореза может появляться в виде полос в области 25–35 кДа. На электрофореграмме были получены мажорные полосы в данной области.

Поскольку факторы свертывания крови представлены достаточно большим количеством белков, гомологи которых могут быть обнаружены в составе слизи кожи рыб, было принято решение использовать носитель Нерагин sepharose FF для разделения смеси. Данный тип носителя часто используется для очистки белков плазмы крови, а также факторов свертывания крови, имеющих сродство к гепарину. Элюцию осуществляли 10 мМ натрий-цитратным буфером pH 7,4 со ступенчато повышающейся концентрацией натрия хлорида. Было установлено, что фракции образцов пробы 1 слабо удерживаются на носителе, поэтому не удалось достигнуть четкого разделения различных компонентов слизи кожи рыб.

Поскольку с помощью аффинной хроматографии на носителе Нерагин sepharose FF не удалось добиться удовлетворительных результатов разделения, на следующем этапе работы была предпринята попытка разделения белковых фракций образцов слизи обоих видов рыб с использованием слабых ионообменных носителей на основе сефадекса. В качестве катионообменного носителя был применен CM Sephadex C-50. Элюцию осуществляли 10 мМ натрий-фосфатным буфером pH 7,0 со ступенчато повышающейся концентрацией натрия хлорида. Было установлено, что фракции обоих образцов практически не удерживаются на носителе, что не позволило достигнуть четкого разделения различных компонентов слизи кожи рыб.

Следующей была предпринята попытка разделения белковых фракций с использованием слабого анионообменного носителя DEAE Sephadex A-50. Элюцию осуществляли 20 мМ бис-трис буфером pH 7,5 со ступенчато повышающейся концентрацией натрия хлорида. Было получено, что образцы пробы 2 практически полностью связывались с носителем. Элюция наблюдалась только при значительном повышении ионной силы раствора (более 0,5 М NaCl), при этом не наблюдалось четкого разделения фракций. Образцы пробы 1 также практически полностью связывались с носителем. При повышении ионной силы раствора наблюдалась элюция отдельных белковых фракций (рис. 3), что было подтверждено с помощью ВСА-анализа.

Можно предположить, что данные условия хроматографического разделения подходят и для образцов пробы 2, однако, ввиду значительно более низкого содержания белка в сравнении с образцами пробы 1 и ограничений чувствительности УФ детектора, не удалось выделить отдельные белковые фракции.

Среди элюируемых проб образца 1 было выделено 6 отдельных пиков, которые были собраны и проанализированы с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Исследованные пробы содержали две мажорные фракции в области 25–35 кДа, которые, вероятно, могут соответствовать белкам, гомологичным тромбопластину и протромбопластину, что ранее было подтверждено с помощью Western-блот анализа и способностью данной белковой фракции взаимодействовать с антителами к указанным белкам [11].

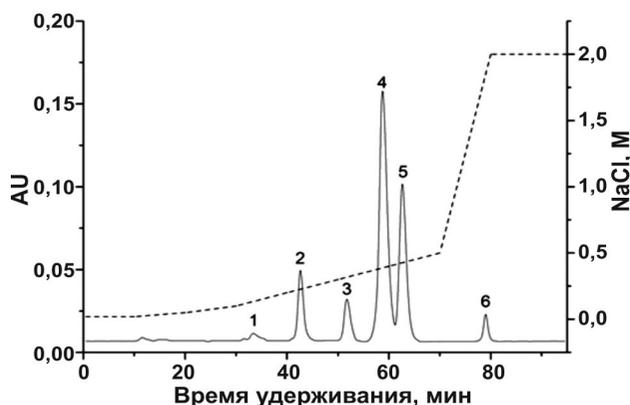


Рис. 3. Профиль элюции образца 1 (сплошная кривая) с носителя DEAE Sephadex A-50 ступенчатым градиентом NaCl от 0,02 до 2 М (пунктирная кривая).

Для подтверждения результатов было проведено разделение белков образца 1 с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях и дальнейшее выделение кусочков геля, содержащих интересующие фракции. Полученные образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии. По результатам анализа полноразмерных белков не удалось определить их точную массу, поскольку в каждом образце содержалась смесь от двух и более белков.

Результаты анализа профиля пептидных отпечатков в базе данных MASCOT позволили определить белки в составе фракций интереса. Найденная последовательность на 60% совпадает с белком *Suiprinus carpio*.

Таким образом, были подобраны методики частичной очистки тромбопластина и протромбопластина из слизи кожи рыб методами аффинной и ионообменной хроматографии с осуществлением качественной оценки с помощью непрямого ИФА и электрофореза. В результате был сделан вывод о возможном присутствии искомых белков, но в незначительных количествах. С помощью ионообменной хроматографии было выделено несколько фракций, предположительно белка TF, что было продемонстрировано полученными электрофореграммами.

MALDI-TOF масс-спектрометрия и последующий анализ профиля пептидной фрагментации целевого белка в базе данных MASCOT продемонстрировали наличие аминокислотной последовательности в одной из фракций, которая на 60% совпадала с белком *Suiprinus carpio*.

К сожалению, среди идентифицированных не удалось обнаружить белков, имеющих аналогичные либо высокогомологичные аминокислотные последовательности с тромбопластином и протромбопластином человека. Однако, учитывая способность слизи кожи рыб стимулировать коагуляцию, а также способность отдельных фракций взаимодействовать с антителами к тромбопластину и протромбопластину, можно с определенной долей вероятности утверждать, что идентифицированные белки имеют эпитопы, гомологичные по функциям тромбопластину или протромбопластину, благодаря которым компоненты слизи кожи рыб способны уменьшать время коагуляции. В дальнейших исследованиях необходима дополнительная разработка методов очистки выделенных компонентов белковых фракций на основе подобранных методик,

подробный анализ их влияния на время коагуляции образцов крови и последующей идентификацией выделенных минорных белков с помощью физико-химических методов анализа.

Литература

1. Соловьев В.Б., Малащенко Т.А. Выделение и изучение физико-химических свойств пептидов из слизи моллюсков // *Actualscience*. – 2016. – Т. 2. – №. 6. – С. 11-13.
2. Ксенофонтов А.М., Никифоров П.В., Федоров А.П. Экспериментальный метод применения биологического клея на основе плавательного пузыря осетра при операциях на печени // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 223-224.
3. Урымбаева Л.К., Дорофеева Н.В., Мачнева И.В. Основные направления создания лекарственных препаратов // *Материалы X Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум»* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2018/article/2018000569>.
4. Lewis R.W. Fish cutaneous mucus: a new source of skin surface lipid // *Lipids*. – 1970. – Т. 5. – №. 11. – С. 947-949.
5. Shephard K.L. Functions for fish mucus // *Reviews in fish biology and fisheries*. – 1994. – Т. 4. – №. 4. – С. 401-429.
6. Rothwell S.W., Settle T., Wallace S. The long term immunological response of swine after two exposures to a salmon thrombin and fibrinogen hemostatic bandage // *Biologicals*. – 2010. – V. 38. – I. 6. – P. 619-628.
7. Пептиды из рыб — фармакологические свойства и способы получения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ideal-pharma.ru/baza/peptidy-iz-ryb-farmakologicheskie-svoystva-i-sposoby-polucheniya/>.
8. Лебедева Н.Е., Восилена М.З., Головкина Т.В. Изменение биохимического состава наружной слизи рыб при воздействии факторов окружающей среды // *Доклады РАН*. – 1998. – Т. 362. – №. 5. – С. 713-715.
9. Виноградов Е.В. Содержание эритроцитов в кожной слизи карпов, отобранных на устойчивость к неблагоприятным факторам среды // *Вестник Государственной полярной академии*. – 2011. – №. 1. – С. 40.
10. Rakers S. et al. 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology // *Experimental dermatology*. – 2010. – Т. 19. – №. 4. – P. 313-324.
11. Фомина Л.Л. Выделение и изучение активных компонентов слизи кожи рыб как основы гемостатического препарата / *Отчет о НИР № 878-18 от 09.07.2018 (РФФИ)* – 43 с.
12. Фомина Л.Л., Кулакова Т.С., Жунина О.А., Ошуркова Ю.Л., Вайцель А.Э. Оценка гемостатической активности слизи кожи рыб *in vitro* // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. – 2018. – №. 4 (40). – С. 7-11.
13. Fomina L.L., Kulakova T.S., Zhunina O.A., Oshurkova Yu.L., Vaitse A.E. Hemostatic activity of the mucus of the skin of fish // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2018. – V. 9. – № 6. – P. 1130-1136.
14. Schultz I.R., Skillman A., Nicolas J.-M., Cyr D.G., Nagler J.J. Short-term exposure to 17alpha-ethynylestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2003. – № 22(6). – P. 1272-1280.
15. В России разработано новое гемостатическое средство // *Военно-промышленный курьер* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vprk-news.ru/news/25817>.

Поступила в редакцию 27.01.20
После доработки 10.03.20
Принята к публикации 15.03.20