

ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ С ВЫСОКОЙ ОСМОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ У ЩУКИ *ESOX LUCIUS*

© 2025 г. А. М. Андреева^{1,*}, З. М. Базарова¹, М. А. Константинов², И. Ю. Торопыгин^{1,2},
Р. А. Федоров¹, Д. В. Гарина¹, А. С. Васильев¹

¹Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН пос. Борок Ярославской обл., Россия

²Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, г. Москва, Россия

*E-mail: aam@ibiw.ru

Поступила в редакцию 03.12.2024 г.

После доработки 06.02.2025 г.

Принята к публикации 11.02.2025 г.

Проведены поиск и идентификация белков с высокой осмотической активностью (*osmotically active proteins*, OAPs) в сыворотке крови представителя альбумин-содержащих костистых рыб — щуки обыкновенной *Esox lucius* L. с помощью методов 2D-электрофореза и масс-спектрометрии MALDI. С помощью критерия высокого отрицательного заряда белков в диск-электрофорезе было идентифицировано 8 внеклеточных и один внутриклеточный OAPs. Их суммарное относительное содержание составило ~60% от общего белка сыворотки: ~30% у гемопексина, ~10 и ~12% у ингибиторов протеиназ и аполипопротеинов A (в составе липопротеинов высокой плотности) соответственно, 3.6% у альбумина и “следы” у внутриклеточного Grb14. Согласно аннотациям генной онтологии, основные функции OAPs связаны с защитой и транспортом, а проявлением высокой осмотической активности они обязаны высокому отрицательному заряду. Сравнение списков OAPs у альбумин-содержащей щуки и у безальбуминовых костистых рыб указывает на их совпадение по всем внеклеточным белкам, кроме альбумина. В свете безальбуминовой модели капиллярного обмена, этот факт предполагает рядовую, а не ключевую роль альбумина в контроле осмотического гомеостаза внутри организма. Множественность OAPs в крови костистых рыб отличает их от млекопитающих, у которых на контроле капиллярного обмена жидкости специализируется сывороточный альбумин.

Ключевые слова: щука обыкновенная, белки с высокой осмотической активностью, сыворотка крови, электрофорез, MALDI

DOI: 10.31857/S0044452925010067, **EDN:** CGQTCK

ВВЕДЕНИЕ

Сывороточный альбумин считается ключевым фактором регуляции капиллярного обмена жидкости, лежащего в основе поддержания осмотического гомеостаза в организме позвоночных [1–4]. Тем не менее потеря гена альбумина в ходе третьей полногеномной дупликации в массовых группах костистых рыб — костнопузырных (*Ostariophysi*) и колючеперых (*Acanthopterygii*) — не имела для них каких-либо драматических последствий. Данное обстоятельство может иметь два объяснения: либо в крови рыб содержатся другие и столь же эффективные по осмотической активности белки, которые компенсируют потерю альбумина, либо, в отличие от млекопитающих, альбумин рыб не является значимым фактором осмотической регуляции внутри организма.

Важный критерий, которому должны соответствовать белки, заместившие осмотически актив-

ный “утерянный” альбумин, касается их поверхностного электрического заряда. Для эффективного связывания и удержания воды внутри сосудов белки-заместители должны иметь (подобно альбумину млекопитающих) более высокий, чем у других белков плазмы, отрицательный заряд. Именно это свойство белка и обеспечивает его максимальную эффективность в связывании катионов Na^+ , усиливающих притяжение к белку диполей воды. Такие белки плазмы рыб были названы *белками с высокой осмотической активностью* или *осмотически активными белками* (OAPs) [5].

Поскольку величина вклада белка в осмотические свойства плазмы определяется его концентрацией (в соответствии с уравнением Вант-Гоффа для коллоидных растворов), то и OAPs должны быть представлены в плазме рыб вполне ощутимыми концентрациями, сопоставимыми с концентрацией сывороточного альбумина в плазме млекопитающих (~60% от общего белка плазмы) [4, 6–8].

Расчеты на примере безальбуминовой атлантической трески *Gadus morhua* показали, что на фракцию из OAPs приходится половина общего белка сыворотки и что среди OAPs доминируют аполипопротеины (Apo) в составе липопротеинов высокой плотности (HDL), гемопексины (Hx) и ингибиторы протеиназ (Inh) [5]. Такой состав OAP фракции согласуется с положениями безальбуминовой модели капиллярного обмена [9], согласно которой осмотическую функцию “утерянного” в ходе эволюции альбумина у безальбуминовых рыб могут выполнять множественные белки разных функциональных классов.

Между тем к группе Teleostei относятся и низшие костистые (Protacanthopterygii) — щуковые (Esocidae), лососевые (Salmonidae) и аравановые (Osteoglossidae), чьи гены сохранили гены альбумина [10] (NCBI: XP_012992300.1, XP_018613844.1). Различаются ли списки ОАБ у низших костистых и безальбуминовых рыб — неизвестно. Между тем ответ на этот вопрос может помочь в оценке значимости альбумина как осмотически активного фактора плазмы крови у низших костистых рыб и других Pisces.

Цель исследования — (1) идентифицировать сывороточные белки с высоким отрицательным зарядом (OAPs) у щуки обыкновенной *Esox lucius* L., (2) оценить относительное содержание OAPs, включая альбумины, в сыворотке крови рыб, (3) охарактеризовать основные функции OAPs с помощью аннотаций генной онтологии (Gene Ontology, GO) и (4) сравнить состав фракций из OAPs у щуки и безальбуминовых костистых рыб, обсудить их сходство и различия в формате “безальбуминовой” гипотезы капиллярного обмена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

В работе использовали щуку обыкновенную *Esox lucius* L. (Protacanthopterygii, Esociformes, Esocidae). Ее геном содержит гены альбумина (NCBI: albumin gene ID 105008514, 105014523). Выборка из 10 рыб состояла из самцов (6) и самок (4) с гонадами II, III, III–IV стадий зрелости, отловленных в Рыбинском водохранилище в ноябре; показатели длины ad и ab по Смиту варьировали от 27.3.0 до 29.7 см и от 29.6 до 32.0 см.

Получение сыворотки крови

После каудоэктомии рыб индивидуальные образцы крови собирали в пластиковые пробирки. Далее кровь отстаивали в холодильнике при 4°C в течение ночи, после чего жидкость над сгустком осторожно отбирали пипеткой. Отделенные образ-

цы сыворотки собирали в чистые пластиковые пробирки и сразу использовали для электрофореза.

Определение концентрации общего белка в сыворотке крови

Для определения концентрации белка в сыворотке использовали микробиуретовый метод [11].

Электрофорез

Белки сыворотки разделяли методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Для определения границ фракций из OAPs использовали диск-электрофорез (диск-Е) в 7.5% ПААГ. Для дифференцирования фракций на отдельные белки использовали 2D-электрофорез (2D-Е) с диск-Е в первом направлении и SDS-электрофорезом (SDS-Е) в 12.5% ПААГ (восстанавливающие условия) — во втором направлении [12]. Отдельные белковые пятна после SDS-Е вырезали для MALDI — идентификации. Для приготовления разделяющего и концентрирующего геля использовали трис-HCl буфер с pH 8.9 и 6.9 соответственно. В лунки концентрирующего геля вносили 1.5–2 мкл сыворотки (~6–8 мкг белка), разведенной таким же количеством 40%-ного раствора сахарозы. После диск-Е гели фиксировали 10%-ной трихлоруксусной кислоте и после отмывания окрашивали 0.01%-ным раствором Coomassie R-250 на смеси этанол — уксусная кислота — вода в соотношении 10:1:30. После SDS-Е гели фиксировали 70%-ным изопропиловым спиртом и далее окрашивали 0.04%-ным раствором Coomassie R-250, приготовленным на смеси изопропанол — этанол — уксусная кислота — вода в соотношении 2:1:1:6. Величину молекулярной массы (Mr) нативных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), в состав которых входят доминирующие в сыворотке белки аполипопротеины, определяли в градиенте концентраций (5–40%) ПААГ с использованием маркеров молекулярной массы — полимерных форм бычьего сывороточного альбумина БСА (67, 134, 201, 268, 335, 402 kDa) и овальбумина ОА (45, 90, 135, 190 kDa). Для расчета величин Mr тестируемых белков в SDS-Е (Mr obs) использовали маркеры в составе набора PageRulerTM Prestained Protein Ladder Plus (10, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa) (Fermentas, США).

Определение положения фракции из OAPs на электрофореграмме. Критерии OAPs

Положение фракции из OAPs в диск-Е определяли по белку — “навигатору” трансферрину (Tf), место которого на протемной карте сыворотки определяли с помощью MALDI [5]. В диск-Е фракция из OAPs со стороны катода была ограничена трансферрином, а со стороны анода — границей красителя бромфенолового синего (БФС);

в 2D-E — фракция из OAPs располагалась в правом поле относительно Tf. Для сравнения состава фракции из OAPs рыб с млекопитающими, использовали аннотированные электрофореграммы сыворотки (плазмы) человека [13].

Оценка OAPs по величине относительного отрицательного заряда

Для оценки электрического заряда белка (q) использовали показатель электрофоретической подвижности $Rf(q)$. Его обозначение отличается от общепринятого (Rf) тем, что рассчитывается не относительно красителя БФС, а относительно маркера, чей заряд принимается за стандарт — мономерной формы HSA. Величина $Rf(q)$ рассчитывается как отношение значений Rf тестируемого белка и Rf_{HSA} (мономера) в диске-E: $Rf(q)_{OAP} = Rf_{OAP} / Rf_{HSA}$; для HSA показатель $Rf(q) = 1.0$. Если $Rf(q)_{OAP} > 1.0$, то белок имеет более высокий отрицательный поверхностный заряд по сравнению с HSA; если $Rf(q)_{OAP} < 1.0$, то белок уступает HSA по величине отрицательного заряда.

Оценка относительного содержания OAPs в сыворотке крови

Для расчета относительного содержания отдельных белков (relative content, RC) и всех белков из OAP фракции (total relative content, TRC) использовали программный пакет ONE — Dscan, Ver 1.31 (Scananalytic Inc.).

Масс-спектрометрия MALDI

Для MALDI вырезали отдельные белки из геля после 2D-SDS-PAGE. Пробоподготовку проводили по протоколу: кусочек геля с белком дважды промывали для удаления красителя путем инкубации в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1 M NH_4HCO_3 в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли по 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05M NH_4HCO_3 в концентрации 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 4 ч при 40°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5% трифтормукусной кислоты в 10%-ном водном ацетонитриле и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения масс-спектров. Масс-спектры (ms) получали на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов в линейной моде, с использованием рефлектрона и в тандемном режиме; обрабатывали с помощью программного пакета Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия). При помощи программы Mascot (опция “пептидный фин-

герпринт”, www.matrixscience.com) устанавливали расчетные величины молекулярной массы Mr_{calc} (Da) и проводили поиск в DB NCBI среди белков всех организмов. При необходимости получали спектры фрагментации ms/ms отдельных пептидов в тандемном режиме. С использованием программ Biotools 3.0 и Flex Analysis 2.4 (Bruker Daltonics, Германия) проводили поиск по ms/ms; для оценки достоверности отобранных белков-кандидатов использовали показатель достоверности *score*. Если кандидаты обнаруживались в неаннотированной DB в виде библиотек кДНК, сконструированных на основе популяций мРНК, то аминокислотную последовательность реконструировали на основе мРНК, используя Protein BLAST; поиск проводили среди белков всех позвоночных. В этом случае значение расчетной Mr_{calc} представляли в виде количества аминокислотных остатков в соответствии с PDB NCBI.

Определение локализации и функций OAPs с помощью генной онтологии

Для определения локализации и функций белков-кандидатов использовали аннотации генной онтологии (Gene Ontology, GO) с использованием базы данных Uniprot. При отсутствии аннотаций GO для кандидатов использовали аннотации для белков-ортологов человека или модельных видов рыб (карп обыкновенный *Cyprinus carpio*).

Статистические методы

Денситометрирование, расчет относительного содержания анодной фракции (TRC) и отдельных OAP (RC), а также величин Mr белков проводили с помощью программы ONE-Dscan, Ver 1.31 (Scananalytic Inc.). Результаты расчета TRC и RC представляли в виде средних значений и стандартной ошибки ($\pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение положения фракции OAB на электрофореграмме

В диске-E фракция из OAPs была дифференцирована на 5–6 белковых полос (рис. 1a). В градиенте концентраций PAG фракция представлена белковыми пятнами с молекулярными массами ~80, 75, 60 и 45 kDa (рис. 1b), а в денатурирующем SDS-PAGE — 7–8 белками с Mr от 14 kDa (белок 9) до 78 kDa (белок 1) (рис. 1c).

Идентификация белков с высокой осмотической активностью

Белки 1–9 (рис. 1b) идентифицировали с помощью MALDI (табл. 1).

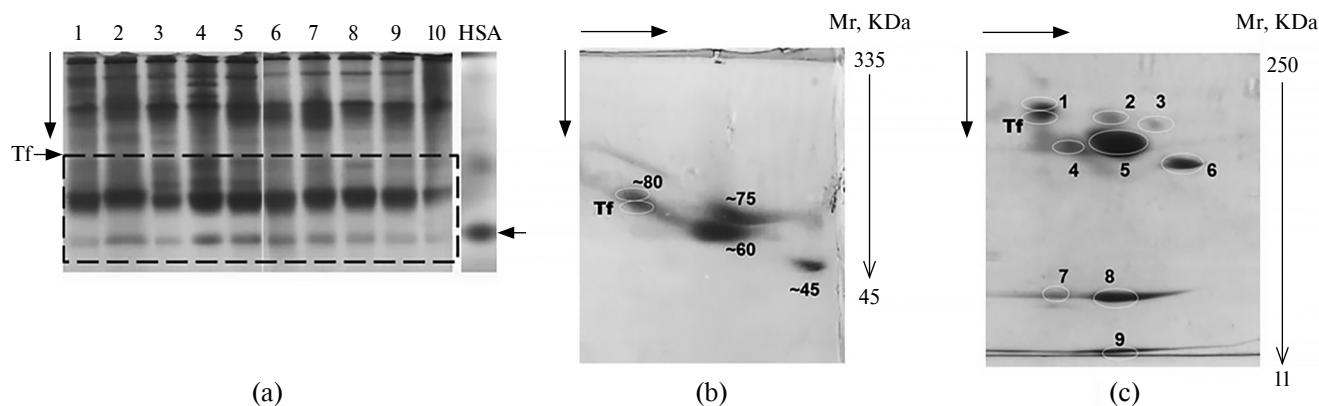


Рис. 1. Электрофорез сыворотки крови щуки *Esox lucius*: (а) — диск-PAGE; (б) и (с) — 5–40%-PAGE и SDS-PAGE соответственно (представлены фрагменты электрофореграмм, содержащие белки с высокой осмотической активностью OAPs). Пунктиром (а) выделена область фракции OAP. HSA — сывороточный альбумин человека, стрелка указывает на мономерную форму белка; Tf — трансферрин; 45, 60, 75, 80 — величины Mr в kDa. Справа от электрофореграмм (б, с) дана шкала Mr (kDa).

Таблица 1. Идентификация белков с высокой осмотической активностью у щуки*

Номер / имя белка	Короткое имя белка	Белки — кандидаты	Protein view (Mascot Search Results)	Mr _{calc} /Mr _{obs} , Da	Score
Tf	Tf	transferrin-a [Esox lucius]	XP_010881843.2	74812/76000	45
1	Fet	PREDICTED: fetuin-B-like [Esox lucius]	XP_010870818.1	53098/78000	66
2	Alb	serum albumin 2 isoform X2 [Esox lucius]	XP_034148111.1	68163/70000	53
3	Grb14	growth factor receptor-bound protein 14 isoform X6 [Esox lucius]	XP_019910538.1	42976/67000	85
4	Hx	hemopexin [Esox lucius]	XP_010901644.4	58128/65000	83
5	Hx	hemopexin [Esox lucius]	XP_010901644.4	58128/65000	157
6	A1AT	PREDICTED: alpha-1-antitrypsin homolog [Esox lucius]	XP_010863100.1	47018/50000	125
7	ApoAI	apolipoprotein A-Ib [Esox lucius]	XP_010869257.1	29609/26000	110
8	ApoAI	apolipoprotein A-Ib [Esox lucius]	XP_010869257.1	29609/26000	154
9	ApoAII	apolipoprotein A-II [Esox lucius]	XP_034144609.1	15439/14000	79

*Наименование и нумерация белков даны в соответствии с рисунком 1с

Таблица 2. Относительное содержание отдельных белков из фракции OAPs (RC) и всей фракции OAP (TRC) у щуки

Относительное содержание белка в сыворотке крови (RC, %)						Относительное содержание фракции OAPs в сыворотке крови (TRC, %)
A1AT	Fet	Apo(HDL)	Hx	Alb	Grb14	
4.9±0.95	5.7±0.8	12.3±1.5	30.3±6.5	3.6	следы	60.6±5.1

Определение относительного содержания OAPs в сыворотке щуки

Концентрация общего белка в сыворотке щук составила 3.31 ± 0.86 г%. Значения RC варьировали от 3.6% до 30.3%, значение TRC превысило половину от общего белка сыворотки (~ 2.0 г%) (табл. 2).

Таким образом, среди OAPs максимальное относительное содержание приходится на гемопексин, а

минимальное на Grb14: Hx → Apo (A-I, A-II, A-IV) → Inh (alpha-antitrypsin, fetuin) → Albumin → Grb14 (ряд по убыванию величины RC).

Характеристика OAPs по величине отрицательного поверхностного заряда

В диск-электрофорезе значения показателя Rf(q), характеризующего относительную величину

отрицательного заряда нативных OAPs, изменились в ряду:

$$0.58 (\text{Fet}) \rightarrow 0.81 (\text{Alb, Hx, HDL, Grb14}) \rightarrow 1.04 (\text{A1AT})$$

Для белка-навигатора трансферрина, по которому определяли положение фракции из OAP в диск-Е, величина показателя $Rf(q)$ составила 0.58, что совпадает со значением $Rf(q)$ для фетуина, так как оба белка расположены в одной зоне подвижности.

Для нативных белков — Fet, Alb, Hx, Apo (в составе HDL) и Grb14 — значения коэффициента $Rf(q) < 1.0$, следовательно, эти белки уступают маркеру — альбумину человека (мономеру) — по величине отрицательного заряда. Для белка A1AT значение коэффициента составило 1.04, из чего следует, что данный белок имеет сопоставимый с HSA отрицательный поверхностный заряд, незначительно превышая его.

Локализация и функции OAPs щуки в терминах генной онтологии

OAPs щуки принадлежат разным суперсемействам, к которым относятся и белки-ортологи человека (табл. 3).

Согласно аннотациям GO, перечисленные в таблице белки, кроме Grb14, являются внеклеточными; Grb14 является внутриклеточным белком. Внеклеточные OAPs щуки задействованы в транспортных и регуляторных функциях\процессах и защитных реакциях организма, включая реакцию острой фазы воспаления; внутриклеточный Grb14

играет роль в сигнальных путях, регулирующих рост и метаболизм (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты поиска белков с высокой осмотической активностью в сыворотке щуки по критерию высокого отрицательного заряда

Выполняя поиск белков с высоким отрицательным зарядом, мы очертили границы фракции из OAPs в электрофорезе сыворотки щуки — к аноду от навигатора Tf и до границы БФС. В этой области было обнаружено 7 белков: fetuin-B и alpha-1-antitrypsin, albumin, haptoglobin, аполипопротеины A-I и

Таблица 3. Принадлежность белков с высокой осмотической активностью щуки к суперсемействам*

Наименование белка (OAP)	Суперсемейство
Hx	cl02471: HX
Fet	cl09238: CY
A1AT	cl38926: Spi
ApoA-I	cl27567: Apolipoprotein (A1/A4/E domain)
ApoA-II	cl04697: ApoA-II
Alb	cl00031: ALBUMIN
Grb14	cl15255: SH2

*в соответствии с PDB NCBI (Protein Data Bank)

Таблица 4. Классификация белков OAPs щуки согласно аннотациям генной онтологии

Белок	Клеточная	Молекулярная функция	Биологические процессы
Fet	внеклеточное пространство	активность ингибитора эндопептидазы цистеинового типа	негативная регуляция эндопептидазной активности
Alb	внеклеточное пространство	связывание липидов; связывание ионов металлов	передача сигналов
Hx	внеклеточное пространство	активность трансмембранных переносчиков гема; связывание ионов металлов	внутриклеточный гомеостаз ионов железа
A1AT	внеклеточное пространство	активность ингибитора эндопептидазы серинового типа	реакция острой фазы; свертывание крови
ApoA-I	внеклеточное пространство	связывание липидов	транспорт липидов; процесс метаболизма липопротеинов
ApoA-II	внеклеточное пространство	связывание липидов	транспорт липидов; процесс метаболизма липопротеинов
Grb14	цитоплазма; цитозоль; мембрана эндосомы; внутриклеточная связанные с мембраной органелла; плазматическая мембрана	активность молекулярного адаптера; адапторная активность, которая объединяет ≥ 2 макромолекул в контакте; связывание рецепторной тирозинкиназы	путь передачи сигнала инсулина; отрицательная регуляция сигнального пути рецептора инсулина; передача сигналов insulin receptor signaling pathway; negative regulation of insulin receptor signaling pathway; signal transduction

A-II (в составе HDL) и growth factor receptor-bound protein 14. Среди них максимально высокий отрицательный заряд был обнаружен не у альбумина, а у серпина A1AT. При этом альбумин щуки уступает, а A1AT, наоборот, превосходит белок-маркер HSA — по величине отрицательного заряда, а значит, и по осмотической активности. Остальные белки щуки имели меньший по сравнению с A1AT и маркером HSA отрицательный заряд, который, однако, был выше, чем у глобулинов сыворотки, расположенных на электрофореграмме к катоду от Tf.

Сравнение списков OAPs у щуки и трески

Список OAPs у безальбуминовой атлантической трески [5] содержал те же внеклеточные белки, что и у щуки (Fet, A1AT; Hx; Aro в составе HDL), только в нем отсутствовал альбумин. Среди OAPs и щуки, и трески найдены внутриклеточные белки: у щуки — следы Grb14, а у трески — протеазы и белки мышечного комплекса в достаточно высокой концентрации (мг/мл). Данное обстоятельство может быть связано с двигательной активностью рыб; у трески как пелагического хищника белки мышечного комплекса попали в кровь, возможно, при разрывах мышечных волокон при активном плавании; у хищника-засадчика щуки наличие среди OAPs внутриклеточного белка, скорее всего, отражает процессы клеточного обновления.

Сравнение относительного содержания OAPs в сыворотке щуки и других рыб

Элементом сходства OAPs фракций у щуки и трески является сопоставимо высокое относительное суммарное содержание всех белков фракции (TRC): $60.6 \pm 5.1\%$ у щуки и $51.2 \pm 6.5\%$ у трески. Однако среди OAPs щуки доминирует гемопексин (RC~30%), а у трески — аполипопротеин A-I (в составе HDL) (RC~25%) [5]. У щуки содержание AroA-I (в составе HDL) хотя и достаточно высоко (RC~12%), но все же в 2.5 раза уступает данному показателю у трески. А в сыворотке карповых и лососевых рыб содержание HDL (AroA-I) достигает 30–36% [14–16].

Особенностью щуки является наличие в ее крови альбумина. Однако, учитывая его невысокое содержание (RC~3.6%), можно считать его вклад в осмоляльность плазмы незначительным. Это отличает щук от лососевых рыб, у которых доля альбумина превышает 25% от общего белка плазмы [17–20].

Сравнение списков OAP у щуки и человека (млекопитающих)

У человека в электрофорезе сыворотки фракция к аноду от Tf содержит те же белки, что и фракция OAPs у щуки, а именно: сывороточный альбумин, альфа-1-антитрипсин и аполипопротеины A (в со-

ставе HDL); также у человека в составе фракции обнаружен миорный преальбумин транстиретин (TTR) и отсутствует гемопексин [13].

Что касается TTR, то не исключено, что этот белок может находиться и среди OAPs щуки, но не выявлен ввиду его чрезвычайно низких концентраций в крови рыб, уступающих млекопитающим в ~100 раз [21, 22]. А сывороточный гемопексин человека входит в состав бета-глобулинов [13], а это значит, что он уступает гемопексину щуки по величине отрицательного заряда. Концентрация гемопексина в крови щуки оказалась гораздо выше (>> чем в 10 раз), чем в сыворотке человека (0.4–1.5 мг/мл) [23].

Несмотря на то что кровь щуки содержит альбумин, его относительное содержание в сыворотке почти в 17 раз ниже, чем в сыворотке крови у Mammalia [6–8].

Таким образом, в составе фракции сыворотки человека, совпадающей по расположению в электрофорезе с фракцией OAPs у щуки, однозначно доминирует альбумин, а на все другие белки приходится ~5–6%, из них: 3.5% на A1AT (2.0–2.5 мг/мл) [24], 0.6% на TTR (<0.4 мг/мл) [25] и 0.2–1.8% на AroA-I в составе ЛПВП (рассчитано по [5, 14–16, 26]. У щуки общий белок распределен по OAPs более равномерно: ~30% приходится на гемопексин, ~12% — на Aro (в составе HDL), ~10% — на ингибиторы протеиназ и 3.6% — на альбумин.

Все обнаруженные в крови рыб внеклеточные белки с высокой осмотической активностью присутствуют в списках белков плазмы человека [27], что согласуется с представлениями о консервативном составе белков плазмы позвоночных. Только у млекопитающих в качестве белка с максимально высоким отрицательным зарядом и, соответственно, с наиболее высокой осмотической активностью выступает специализированный белок сывороточный альбумин, ключевой вклад которого в онкотическое давление плазмы обусловлен его самой высокой концентрацией среди белков плазмы. А в профиле белков с высокой осмотической активностью щуки доминирует гемопексин, при этом максимально высокий заряд и осмотическую активность проявляет альфа-1-антитрипсин; остальные белки имеют промежуточные показатели заряда и RC.

Анализ списка OAP щуки в свете безальбуминовой модели

Относительно высокая представленность в профиле OAPs щуки каждого из идентифицированных внеклеточных “истинных” белков плазмы (в соответствии с классификацией Putnam F.W. [28]) согласуется с положением безальбуминовой модели капиллярного обмена [9]. Согласно этой модели, в крови безальбуминовых костищных рыб имеется фракция из множественных белков-заместите-

лей альбумина, в которой доминируют гемопексины, ингибиторы протеиназ и аполипопротеины в составе HDL. Сравнение списков OAPs у альбумин-содержащей щуки и безальбуминой атлантической трески [5] выявило их различия по наличию альбумина и полное совпадение по доминантным OAPs. Данное обстоятельство, как и то, что (а) альбумин щуки представлен в сыворотке не столь высокой концентрацией как другие OAPs и что (б) его отрицательный потенциал уступает другим OAPs, позволяют полагать, что роль альбумина как фактора осмотического гомеостаза в организме щуки не является ключевой.

В свете безальбуминовой модели и у трески, и у щуки за поддержание осмотического гомеостаза в организме в значительной степени ответственны доминирующие среди OAPs гемопексины, ингибиторы протеиназ и аполипопротеины в составе HDL. Основные функции этих белков, согласно аннотациям генной онтологии, касаются защиты и транспорта. Востребованность в транспортной функции обусловлена необходимостью поддержания обменных процессов в организме, а защитной функции — обилием микроорганизмов в водной среде, включая патогенные формы. Имеющиеся в литературе данные указывают на рост содержания в крови рыб гемопексина и ингибиторов протеиназ при ряде микробных инфекций [29–32]. Вероятно, эволюция этих белков у рыб шла в направлении усиления их отрицательного поверхностного потенциала, что позволило им стать (помимо основных функций) и эффективными осмотически активными регуляторами плазмы. Действительно, сравнение электрофоретической подвижности гемопексина и А1АТ человека [13] с белками-ортологами щуки указывает на то, что белки человека уступают белкам рыб по величинам Rf и Rf(q).

Поскольку рыбы, в отличие от наземных позвоночных, не нуждаются в высоком давлении крови, то содержание в их интерстиции значительных количеств белка является скорее нормой, чем исключением. А это обстоятельство предполагает снижение степени проявления осмотической активности альбумина за счет эффекта Гиббса–Доннана, обесценивая его. Вероятно, именно по этой причине сывороточные альбумины рыб являются не ключевыми, а рядовыми осмотически активными факторами, разделяя эту функцию с другими белками плазмы, между тем как имеющие более высокий отрицательный заряд транспортные и защитные белки справляются с функцией связывания и удержания воды в сосудистом русле лучше альбумина.

Результаты проведенного исследования подтверждают наличие различий в организованных по единому принципу протеомах плазмы рыб и млекопитающих — по доминированию в них разных

белков — аполипопротеина А-I (в составе HDL) у рыб и альбумина у высших позвоночных. Эти различия могут быть обусловлены разной природой рыб и млекопитающих: первые принадлежат низшим водным пойкилотермным, вторые — высшим наземным гомойотермным *Vertebrata*. Разная природа этих групп позвоночных определяет и особые черты их метаболизма. У рыб липиды и их резервы в организме играют особо важную роль в энергетическом обмене и обеспечивают плавучесть рыб. Поддержание энергетического гомеостаза во время голодания рыб напрямую связано со способностью печени мобилизовать липидные резервы; в отличие от млекопитающих, рыбы значительно легче и эффективнее метаболизируют жирные кислоты (fatty acids, FA) [33]. Эти факты, вероятно, и определяют высокое содержание в крови рыб именно АроA (HDL) как эффективных переносчиков липидов.

На то, что АроA (HDL) являются более эффективными транспортерами FA и других липидов, чем альбумины, указывает ряд фактов: (1) АроA в составе HDL участвуют на всех этапах прямого и обратного транспорта липидов, а Alb — в транспорте FA только на заключительном этапе их передачи от Аро клеткам; (2) Аро синтезируются в более широком перечне тканей, чем Alb; (3) HDL обеспечивает больший объем транспорта липидов, чем Alb, имеющий ограниченное число сайтов связывания FA; (4) HDL транспортируют более широкий спектр липидов, чем Alb; (5) HDL передают липиды клеткам разнообразными способами (пассивный и рецептор-опосредованный транспорт) и представлены широким размерно-композиционным рядом, в котором разные формы АроA за счет разного сродства к лигандам охватывают и контролируют все липидные потоки в организме — все эти достоинства АроA (HDL) в целом позволяют предположить возможность организации липидных потоков в крови рыб и без участия Alb [34].

У млекопитающих сывороточный альбумин зарекомендовал себя как эффективный транспортный белок, но, как показано выше, с более ограниченными возможностями для транспорта липидов. Вероятно, такой транспортный профиль Alb обусловлен наличием в плазме млекопитающих специализированных белков, отвечающих за транспорт разных групп лигандов: HDL (транспорт, прежде всего, липидов и других соединений), гаптоглобинов (связывание свободного гемоглобина), гемопексина (связывание гема), трансферрина (связывание железа) и др. [35]. Наземный образ жизни, потребовавший выраженной барьерной функции стенки капилляра в отношении белков, определил основной способ реализации белками плазмы млекопитающих осмотической активности — с участием эффекта Доннана. С помощью этого механизма

наиболее эффективно проявил себя альбумин. Он оказался идеальным белком для выполнения и осмотической функции и транспорта ряда физиологически важных лигандов, в связи с чем эволюция протеома плазмы наземных позвоночных шла по вектору наращивания его содержания в плазме. А HDL в крови млекопитающих являются важными транспортными и стабилизирующими "платформами", но, судя по их незначительной концентрации, вносящими невысокий вклад в осмотические свойства плазмы.

Исследования вопросов, касающихся разной функциональной нагрузки тех или иных белков в составе тканевых протеомов, а также функциональной компенсации "утерянных" в ходе эволюции белков, несомненно, представляют фундаментальный интерес. С другой стороны, исследование структуры и функций разных стабилизирующих "платформ" плазмы крови позвоночных — HDL и Alb — представляет и практический интерес, например в набирающей обороты области конструирования искусственных или рекомбинантных частиц rHDL [36]. В инфузионной терапии несмотря на то, что альбумин считается золотым стандартом коллоидных плазмозаменителей, вопрос о его роли и эффектах остается предметом продолжающейся дискуссии [37], в связи с чем вполне закономерен интерес к альтернативным естественным коллоидам, в том числе и HDL. Учитывая, что осмотические характеристики плазмы крови пресноводных костистых рыб и человека совпадают в норме и при гипернатремии, изучение ремоделирования HDL под влиянием Na^+ и сопутствующих ремоделированию осмотических эффектов плазмы у модельных видов рыб — может быть полезно для совершенствования протоколов лечения гипернатремии у человека [38, 39].

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с объектом соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике ИБВВ РАН (протокол № 2 от 19.01.2021).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднику ИБВВ РАН И.П. Рябцевой за участие в работе по обработке сыворотки крови щуки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124032500015-7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и организация работы, анализ всех данных, написание статьи принадлежат А.М.А.; отлов рыб, отбор крови, получение сыворотки проведены А.С.В., Д.В.Г.; электрофорез проведен А.С.В., Д.В.Г., Р.А.Ф.; трипсинализ белков, MALDI-анализ и поиск кандидатов проведены З.М.Б., М.А.К. и И.Ю.Т.; анализ GO-аннотаций кандидатов проведен А.М.А.; определение концентрации белка в сыворотке и денситометрия электрофорограмм выполнены Д.В.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N (1998) Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol* 5(9): 827–835. <https://doi.org/10.1038/1869>
- Nguyen MK, Kurtz I (2006) Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *J Appl Physiol* 100: 1293–1300. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01274.2005>
- Minchietti L, Galliano M, Kragh-Hansen U, Peters TJr (2008) Mutations and polymorphisms of the gene of the major human blood protein, serum albumin. *Hum Mutat* 29(8): 1007–1016. <https://doi.org/10.1002/humu.20754>
- Levitt D, Levitt M (2016) Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med* 9: 229–255. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S102819>
- Andreeva AM, Bazarova ZM, Toropygin IYu, Vasiliev AS, Federov RA, Pavlova PA, Garina DV (2023) Serum osmotically active proteins in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Evol Biochem Physiol* 59: 325–336. <https://doi.org/10.1134/S0022093023020023>
- Dziegielewska KM, Evans CA, Fossan G, Lorscheider FL, Malinowska DH, Møllgård K, Reynolds ML, Saunders NR, Wilkinson S (1980) Proteins in cerebrospinal fluid and plasma of fetal sheep during development. *J Physiol* 300: 441. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013171>
- Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, Chruszcz M, Minor W (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol* 52(3–4): 174. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>
- Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Hoy KS, Wa C, De-Bolt E, Koke M, Hage DS (2013) Review: glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 425: 64. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.013>
- Andreeva AM (2020) Structural organization of plasma proteins as a factor of capillary filtration in Pisces. *Inland Water Biology* 13(4): 664–673. <https://doi.org/10.1134/S1995082920060036>
- Nynca J, Arnold G, Fröhlich T, Ciereszko A (2017) Proteomic identification of rainbow trout blood plasma pro-

- teins and their relationship to seminal plasma proteins. *Proteomics* 17(11): 1–15. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600460>
11. *Itzhaki RF, Gill DM* (1964) A micro-biuret method for estimatingproteins. *Anal Biochem* 9: 401–410.
 12. *Laemmli UK* (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
 13. *Gaal O, Medgyesi GA, Vereczkey L* (1980) Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Chichester John Wiley & Sons 83–87.
 14. *Babin PJ, Vernier JM* (1989) Plasma lipoproteins in fish. *J Lipid Res* 30: 467–489
 15. *Stoletov K, Fang L, Choi SH, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C, Pattison J, Juliano J, Miller ER, Almazan F, Cressier P, Witztum JL, Klemke RL, Miller YI* (2009) Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circul Res* 104: 952. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.189803>
 16. *Andreeva AM, Vasiliev AS, Toropygin IYu, Garina DV, Lamash NE, Filippova AE* (2019) Involvement of apolipoprotein A in maintaining tissue fluid balance in goldfish *Carassius auratus*. *Fish Physiol Biochem* 45(5): 1717–1730. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00662-1>
 17. *Byrnes L, Gannon F* (1990) Atlantic salmon (*Salmo salar*) serum albumin: cDNA sequence, evolution, and tissue expression. *DNA Cell Biol* 9(9): 647–655. <https://doi.org/10.1089/dna.1990.9.647>
 18. *Metcalf V, Brennan S, Chambers G, George P* (1998) The albumins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and brown trout (*Salmo trutta*) appear to lack a pro-peptide. *Arch Biochem Biophys* 350(2): 239–244. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0509>
 19. *Metcalf VJ, Brennan SO, Chambers GK, George PM* (1998) The albumin of the brown trout (*Salmo trutta*) is a glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1386(1): 90–96.
 20. *Xu Y, Ding Z* (2005) N-terminal sequence and main characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar*) albumin. *Prep Biochem Biotechnol* 35(4): 283–290. <https://doi.org/10.1080/10826060500218081>
 21. *Campinho MA, Morgado I, Pinto PI, Silva N, Power DM* (2012) The goitrogenic efficiency of thioamides in a marine teleost, sea bream (*Sparus auratus*). *Gen Comp Endocrinol* 179(3): 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.ygenc.2012.09.022>
 22. *Park SW, Kim K, Kim OK, Ro WB, Lee CM* (2023) Evaluation of plasma prealbumin as a novel inflammatory biomarker in dogs: a pilot study. *Front Vet Sci* 10:1142535
 23. *Delanghe JR, Langlois MR* (2001) Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 312(1-2): 13–23. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(01\)00586-1](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00586-1)
 24. *Kueppers F* (1971) Alpha-1-antitrypsin: physiology, genetics and pathology. *Humangenetik* 11(3): 177–189. <https://doi.org/10.1007/BF00274738>
 25. *Dellière S, Cynober L* (2017) Is transthyretin a good marker of nutritional status? *Clin Nutr* 36(2): 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.06.004>
 26. *Jolley CD, Woollett LA, Turley SD, Dietschy JM* (1998) Centripetal cholesterol flux to the liver is dictated by events in the peripheral organs and not by the plasma high density lipoprotein or apolipoprotein A-I concentration. *J Lipid Res* 39(11): 2143–2149.
 27. *Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A* (2004) The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 3: 311. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300127-MCP200>
 28. *Putnam FW* (1975–1987) in: *The Plasma Proteins Structure, Function, and Genetic Control* (Putnam, F. W., ed). New York: Academic Press, 1–55.
 29. *Sha Z, Xu P, Takano T, Liu H, Terhune J, Liu Z* (2008) The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: Its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. *Mol Immunol* 45(5): 1458–1469. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.08.012>
 30. *Sarropoulou E, Fernandes JM, Mitter K, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre MP, Figueras A, Novoa B, Kotoulas G* (2010) Evolution of a multifunctional gene: The warm temperature acclimation protein Wap65 in the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Mol Phylogenet Evol* 55(2): 640–649. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.001>
 31. *Liu F, Su B, Gao C, Zhou S, Song L, Tan F, Dong X, Ren Y, Li C* (2016) Identification and expression analysis of TLR2 in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 55: 654e661. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.047>
 32. *Li C, Gao C, Fu Q, Su B, Chen J* (2017) Identification and expression analysis of fetuin B (FETUB) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) mucosal barriers following bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 68: 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.032>
 33. *Tseng YC, Hwang PP* (2008) Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comp Biochem Physiol Part C* 148: 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>
 34. *Andreeva AM* (2019) The strategies of organization of the fish plasma proteome: with and without albumin. *Russ J Mar Biol* 45(4): 263–274. <https://doi.org/10.1134/S1063074019040023>
 35. *Schulz GE, Schirmer RH* (1979) *Principles of Protein Structure*. New York: Springer-Verlag. 314 p.
 36. *Kornmueller K, Vidakovic I, Prassl R* (2019) Artificial High Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Research. *Molecules* 24(15): 2829(1–28). <https://doi.org/10.3390/molecules24152829>.
 37. *Черный ВИ* (2017) Роль и место альбумина в современной инфузионно-трансфузионной терапии. *Медицина неотложных состояний* 1(80): 23–31. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.1.80.2017.94448>

38. Andreeva AM, Martemyanov V, Vasiliev AS et al. (2022) Goldfish as a model for studying the effect of hypernatremia on blood plasma lipoproteins. *Bratisl Lek Listy* 123(3): 172–177. https://doi.org/10.4149/BLL_2022_028
39. Andreeva AM, Lamash N, Martemyanov VI, Vasiliev AS, Toropygin IY, Garina DV (2024) High-density lipoprotein remodeling affects the osmotic properties of plasma in goldfish under critical salinity. *J Fish Biol* 104(3): 564–575. <https://doi.org/10.1111/jfb.15607>

SEARCH AND IDENTIFICATION OF SERUM PROTEINS WITH HIGH OSMOTIC ACTIVITY IN PIKE *ESOX LUCIUS*

A. M. Andreeva^{a, *}, Z. M. Bazarova^a, M. A. Konstantinov^b, I. Yu. Toropygin^{a, b}, R. A. Fedorov^a, D. V. Garina^a, and A. S. Vasiliev^a

^a*I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Borok, Yaroslavskaya oblast, Russia*

^b*V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, RAS, Moscow, Russia*

**E-mail: aam@ibiw.ru*

The search and identification of proteins with high osmotic activity (OAPs) in the blood serum of a representative of albumin-containing teleost fish — pike *Esox lucius* L. were carried out using 2D-electrophoresis and MALDI mass-spectrometry. Using the criterion of high negative charge of proteins in disk-electrophoresis, 8 extracellular and one intracellular OAPs were identified. Their total relative content was ~60% of the total serum protein concentration: ~30% for hemopexin, ~10 and ~12% for proteinase inhibitors and apolipoprotein A (in high-density lipoprotein composition), respectively, 3.6% for albumin and "traces" of intracellular Grb14. According to gene ontology annotations, the main functions of OAPs are associated with protection and transport, and the manifestation of high osmotic activity of OAPs is due to their high negative charge. Comparison of the list of OAPs in albumin-containing pike with the list of OAPs in albumin-free teleost fish indicates their coincidence in all extracellular proteins except albumin. In light of the albumin-free model of capillary exchange, this fact suggests an ordinary, rather than a key role of albumin in the control of osmotic homeostasis inside the body. The multiplicity of OAPs in the blood of teleost fish distinguishes them from mammals, in which serum albumin specializes in the control of capillary fluid exchange.

Keywords: northern pike, proteins with high osmotic activity, blood serum, electrophoresis, MALDI