

УДК 615.279

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ ТОКСИНЫ ГУАНИДИНОВОГО РЯДА В МОРСКОМ ЧЕРВЕ *CERPHALOTRIX SIMULA*: ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИДОТОВ МОРСКИХ ТОКСИНОВ

© 2016 А.Е. Власенко¹, А.С. Кротов¹, Е.А. Горобец¹, Т.Ю. Магарламов²,
Д.И. Мельникова¹, В.Г. Кузнецов¹

¹ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток

² Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, г. Владивосток

Статья поступила в редакцию 07.11.2016

В работе в морском черве *Cerphalotrix simula* впервые обнаружены и исследованы белковые соединения, обладающие способностью связывать сильнейшие нейротоксины гуанидинового ряда - тетродотоксин-подобные вещества. Методами дот-блот иммуноанализа и нативного белкового электрофореза показана токсин-связывающая активность этих соединений и определена их молекулярная масса 200-220 кДа.

Ключевые слова: гуанидиновые токсины, тетродотоксин-связывающие белки, нейротоксины, антидот

Одной из основных проблем при изготовлении и потреблении морепродуктов является возможность попадания в них различных соединений с высокой токсичностью, вырабатываемых морскими гидробионтами. Такими веществами, характеризующимися сильным нейропаралитическим действием, являются гуанидиновые токсины, ответственные за чрезвычайно сильные, вплоть до летального исхода, отравления. Гуанидиновые токсины включают в себя тетродотоксин (ТТХ) и его аналоги. ТТХ-подобные токсины были обнаружены у животных различных таксономических групп, некоторые из которых являются объектами промысловой охоты: рыбы фугу *Takifugu vermicularis vermicularis*; *Fugu poecilonotus*; *Takifugu niphobles*, синекольчатые осьминоги *Octopus maculosus*, мечехвосты *Carcinoscorpius rotundicauda* и морские брюхоногие моллюски *Natica lineata* и *Niotha clathrata* [1].

Проблема отравления ТТХ и его аналогами остро стоит в странах азиатского и индокитайского регионов - Японии, республики Бангладеш,

Тайваня и Юго-Восточной Азии. Однако все больше токсичных животных обнаруживается и в европейских водах. Их появление объясняется двумя факторами: использованием судами балластных вод и открытием Суэцкого канала, связывающего Индийский и Атлантический океаны. Немаловажную роль в распространении животных, содержащих гуанидиновые токсины, играют и глобальные катаклизмы, такие, как цунами. Так, в 2004 г. цунами, возникшее в Индийском океане, привело к появлению токсичных рыб фугу у берегов Таиланда [2].

Большую роль в распределении животных, содержащих гуанидиновые токсины, играет температура. Повышение или понижение температуры приводит к изменению скорости накопления токсина. Микробные популяции, являясь первоисточником гуанидиновых токсинов в морской среде, также в значительной степени зависят от внешних факторов, в том числе и от температуры. Исследования микробного состава различных органов токсичной рыбы фугу *T. niphobles* показали, что понижение температуры уменьшает разнообразие и выживаемость ассоциированных бактерий [3].

ТТХ и его аналоги являются водорастворимыми и термостабильными, т.е. термическая обработка морепродуктов не убирает, а более того увеличивает их токсичность [4]. Токсический эффект самого ТТХ в сотни раз выше цианистого калия, а антидота от отравления ТТХ-подобными токсинами на сегодняшний день не существует. Попытки поиска препаратов для лечения отравлений токсинами гуанидинового ряда предпринимаются и по сей день. Так, в 1984 г. Кру с соавторами предложили использовать антихолинэстеразные препараты (неостигмин и атропин) для ослабления симптоматики токсического эффекта [5]. Лекарственная терапия не доказала своего положительного эффекта. Еще

Власенко Анна Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: vlasenko.ae.93@gmail.com

Кротов Антон Сергеевич, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: as.krotov94@mail.ru

Горобец Екатерина Алексеевна, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: gorobets.katrin@gmail.ru

Магарламов Тимур Юсифович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: biotimur@yandex.ru

Мельникова Дарья Игоревна, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: dashkatelnikova93@gmail.com

Кузнецов Василий Геннадьевич, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: vas9i-kz@mail.ru

одним перспективным антидотом являются антитела к ТТХ. Ксу с соавторами синтезировал моноклональные антитела и показал эффективность их использования в нейтрализации ТТХ и сакситоксина как *in vitro*, так и *in vivo* [6]. Однако антитела слабо связывали токсины и потому в медицинской практике так и не нашли применения в качестве лекарств против отравлений морепродуктами. Симптомами отравления токсинами гуанидинового ряда являются: периоральная нечувствительность, парестезия, паралич, дыхательная недостаточность, гипоксия, гипотония, брадикардия, рвота, раздражение пищеварительного тракта и др. [7]. В настоящий момент во всех случаях отравления морскими токсинами используется наблюдение и поддерживающая терапия [8]. Так, например, ТТХ выводится из организма в течение 4 дней вместе с мочой и в этот период, в наиболее тяжелых случаях отравления, пациенты находятся на искусственной вентиляции легких.

При поиске антидотов к токсинам гуанидинового ряда целесообразно обратить внимание на ТТХ-носящих животных и выяснить причины их резистентности к токсину. Существует две гипотезы возникновения такой резистентности. Было обнаружено, что белки некоторых наземных ТТХ-носящих животных, формирующие натриевый канал, мутированы, т.е. конформация канала изменена [9-11]. Из чего можно сделать вывод, что на такие мутированные каналы ТТХ не садится. Согласно второй гипотезе, резистентность связана с наличием ТТХ-связывающих белков. Белки, чувствительные к ТТХ и его аналогам, были выявлены в крабе *Hemigrapsus sanguineus*, в некоторых брюхоногих моллюсках [12] и в рыбах фугу *Fugu pardalis* [13] и *Takifugu niphobles* [14].

Немертины – единственные животные, которые целенаправленно используют токсин как «орудие лова» или защиты от врагов, и для этого накапливают его в определенных органах. Так, ультраструктурное изучение немертины *Lineus alborostratus* показало, что ТТХ-подобные токсины локализуется только в секреторных клетках покровного эпидермиса и в железистых клетках эпителия хобота [15]. Столь «жесткая» и «целенаправленная» локализация токсина косвенно указывает на наличие механизма и молекулярных структур, ответственных за его перенос и «удержание». Кроме того, изучение распределения ТТХ и его аналогов на ультрамикроскопическом уровне показало, что токсины ассоциированы с органоидами белкового синтеза – т.е. предположительно, токсины ассоциированы с белками.

Цель работы: произвести поиск токсин-связывающих белков в морском черве *Cephalothrix simula*, как потенциальных антидотов низкомолекулярных токсинов гуанидинового ряда из морских гидробионтов.

Методика исследований. Немертины *C.simula* были собраны в ризоидах бурых водорослей *Saccharina sp.* в заливе Восток залива Петра Великого (Японское море) в июле-августе 2016 г. Немертины содержали в аэрируемых аквариумах с проточной морской водой ($t=17^{\circ}\text{C}$).

Для оценки концентрации гуанидиновых токсинов общую пробу из 5 немертин весом 102 мг тщательно растирали до гомогенного состояния в стерильном ручном гомогенизаторе (EMS, USA). К полученному гомогенату добавляли 0,1% водный раствор уксусной кислоты в соотношении 1:10 и помещали в ультразвуковой гомогенизатор HD 2070 (Bandelin Sonopuls, Германия) на 15 мин, с частотой 20 kHz, амплитудой 228 мкм, с рабочим циклом 0,8 с и интервалом 0,2 с. Полученный экстракт центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, а затем надосадочную жидкость упаривали в вакуумном испарителе при 500°C. Оставшийся после упаривания осадок доводили 0,1% водным раствором уксусной кислоты до 2 мл. Раствор затем фильтровали с помощью 3 кДа фильтров Microcon Ultracel YM-3 (Millipore, США). Для удаления белковой фракции раствор нагревали до 85°C в течение 20 мин, затем коагулированные белки осаждали, а супернатант хранили при -80°C для дальнейших исследований.

Определение концентрации токсинов гуанидинового ряда проводили на культуре клеток мышинной нейробластомы Neuro-2a (ATCC, CCL131), предоставленной банком клеточных культур эукариот университета Лозанны (Швейцария). Культивация велась в среде Игла в модификации Дюльбекко DMEM (Gibco, США) содержащей 4,5 г/л D-глюкозы, а также глютамин, пириват и антибиотики – 1000 U/ml пенициллина и 10 mg/ml стрептомицина (Sigma, США), дополненной 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота FBS (Sigma, США). Культура клеток содержалась в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 80% влажности. Пассирование клеток проводилось по достижению 80% конфлюэнтности раз в 2 дня.

Для проведения эксперимента клетки 2-х дневной культуры собирали из культурального флакона с помощью 0,25% раствора трипсина на фосфатном буфере (PBS) pH 7,4 и ресуспендировали в культуральной среде (DMEM + 5% FBS) до плотности 4×10^5 клеток/мл. Посев клеток производили в 96-луночный планшет (Greiner-Bio-One, Германия) по 50 мкл суспензии в каждую лунку, итоговое содержание клеток в каждой лунке составляло 2×10^4 . Клетки преинкубировали 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5 % CO₂. После 24 ч преинкубации в каждую лунку добавили по 100 мкл тестовых и контрольных растворов и инкубировали 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5 % CO₂. Для приготовления тестовых растворов использовали среду DMEM с 5% FBS, содержащую различные разведения экстрактов *C. simula*, а

также 133 μM вератридина (Sigma, США) в ДМСО и 0,4 мМ водного раствора уабаина (Sigma, США). Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью красителя МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (Sigma, США). Раствор красителя 5 мг/мл в PBS pH 7,4 стерилизовали фильтрованием через 0,22 мкм фильтр (Millipore, США) и добавили по 15 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета. После инкубации в течение 4-х часов при 37°C и 5% CO_2 , образовавшиеся кристаллы формазана растворили добавлением 150 мкл изопропанола с 0,04 М HCl, и перемешиванием на шейкере PST-60HL4 (Biosan, Латвия) при 37°C и 450 rpm в течение 10 мин. Измерение поглощения растворенного красителя для каждой лунки, проводили на спектрофотометре ELx800uv (Bio-Tek Instruments Inc, США) при длине волны 595 нм с референсной длиной волны 630 нм.

Определение содержания ТТХ осуществлялось при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) на хроматографе Shimadzu-LC20 с масс-детектором LCMS-2010EV. Колонка Ascentis Express C18 (зернение 2,7 мкм, длина 15 см и диаметр 2,1 мм). Температура колонки составила 50°C, скорость потока 0,2 мл/мин, элюирование градиентное, начальная фаза – метанол:вода:1% муравьиная кислота (5:90:5) в течении первых 5 мин, далее за 5 мин следовало линейное изменение состава до 90:0:5, и промывка такой системой в течении 20 мин. Образец вводился авто-сэмплером в объеме 5 мкл. Масс-детектор использовался в режиме ионизации распылением в электростатическом поле (ESI), напряжение на капилляре 4.5 кВ. Регистрация ионов в режиме селективного мониторинга (SIM) положительного иона $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 320.1. Количество ТТХ рассчитывалось по площади пика по иону 320.1 с использованием калибровочной кривой, полученной при анализе стандартных образцов ТТХ (Alomone Labs Ltd., Израиль).

Для приготовления белковых экстрактов червей *C. simula* предварительно промывали водой, взвешивали и механически гомогенизировали в буферном растворе в соотношении 1:5, содержащего 1,25 мл 0,5 М Трис-HCl (pH=6,8), 0,1 мл 10% ДСН, 1 мл глицерина, 0,1 мл 0,2 М Na-EDTA, 7,55 мл H_2O . Гомогенат центрифугировали 7 мин при 14000 g, затем отделяли супернатант, прибавляли к нему на каждые 100 мкл по 1 мкл ингибитора трипсина соевых бобов, 1,5 мкл 1М PMSF в ацетоне. Для получения делипидизированного образца полученный гомогенат встряхивали с хлороформом в соотношении 1:5 в течение 15 мин.

Для проведения дот-блота предварительно смоченную в метаноле мембрану помещали на 10 мин в трансфер буфер, точечно наносили три образца (делипидизированный экстракт *C. simula*, стандартный экстракт *C.*

simula и бычий сывороточный альбумин (БСА), растворенный в буфере для образцов для положительного контроля) и выдерживали 2 ч во влажной камере. После этого отмывали мембрану в TBST (20 мМ Трис, 0,02% твин-20, 9 г/л хлорида натрия, pH=7,4) 5 раз по 5 мин, помещали в 3% раствор молока (BioRad, США) в TBST на ночь при 4°C. Затем инкубировали мембрану с раствором цитрата ТТХ в TBST в соотношении 1:1000 в течение 2 ч, отмывали 5 раз по 5 мин в TBST. За этим следовало выдерживание мембраны в поликлональных IgG против ТТХ в разведении 1:200 в 0,5% растворе молока в TBST в течение 1,5 ч при непрерывном перемешивании. Мембрану отмывали 5 раз по 5 мин TBST. Затем вносили антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1:200 в 0,5% растворе молока в TBST, инкубировали 1 ч при перемешивании. Мембрану отмывали 5 раз по 5 мин TBST, после чего вносили субстрат (1 мг/мл диаминобензидин (ДАБ) в фосфат-цитратном буферном растворе, (pH=7,5), перед внесением добавляли H_2O_2 до концентрации 0,02-0,03%), инкубировали 5 мин при встряхивании. Для остановки реакции мембрану промывали дистиллированной водой 5 раз.

Для разделения белков в нативных условиях модифицировали ДСН-ПААГ-электрофорез, используя 10% разделяющий гель с уменьшенной в 10 раз концентрацией ДСН. Для приготовления 30 мл 10% разделяющего геля смешивали 7,5 мл 40% акриламида (содержащего 0,8% метиленис-акриламида), 14,08 мл H_2O , 7,5 мл 1,5 М Трис-HCl (pH=8,8), 0,03 мл 10% ДСН, 0,15 мл 0,2 М Na-EDTA, 21 мкл TEMED, 72 мкл 2% ПСА. Полученный раствор заливали между стеклянными пластинами, после окончания полимеризации отмывали гель дистиллированной водой, заливали 4% концентрирующий гель, для приготовления 10 мл которого смешивали 1 мл 40% акриламида, 5,88 мл H_2O , 2,5 мл 0,5 М Трис-HCl (pH=6,8), 0,01 мл 10% ДСН, 0,1 мл 0,2 М Na-EDTA, 0,0125 мкл TEMED, 400 мкл 2% ПСА. Образцы вносили по 5-20 мкл в каждый карман геля, погруженного в электродный буферный раствор (0,025 М Трис, 0,192 М глицин, 0,01% ДСН, pH=8,3). В отдельный карман наносили стандарты молекулярных масс на 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 и 250 кДа (BioRad, США). Электрофорез проводили при силе тока 7 мА для концентрирующего слоя, 10 мА – для разделяющего. После окончания электрофореза гель оставляли на 1,5 ч в фиксирующем растворе. Белковые зоны окрашивали нитратом серебра.

После проведения нативного электрофореза гель инкубировали в буферном растворе для переноса (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 0,01% ДСН, 20% метанол) 15 мин. Затем гель помещали на нитроцеллюлозную мембрану и собирали сэндвич для переноса. Перенос проводили в течение 1,5 ч при силе тока 150 мА в буферном

растворе для переноса. Затем оставляли мембрану в 3% растворе молока (BioRad, США) в TBST (20 mM Трис, 0,02% твин-20, 9 г/л хлорида натрия, pH=7,4) на ночь при 4°C. Затем мембрану разрезали на полосы согласно схеме нанесения образцов в карманы геля при нативном электрофорезе, повторяли обработку мембраны по схеме, описанной в методике проведения дот-блота.

Результаты и их обсуждения. Согласно данным японских исследователей, немертину из рода *Cephalothrix* являются наиболее токсичными ТТХ-содержащими животными [16]. Однако токсичность экстрактов из *C. simula* сильно варьируется в зависимости от условий обитания немертин и инструментальных методов оценки

токсичности. Асакава с соавторами показали недостаточно четкую сезонную зависимость концентрации ТТХ и его аналогов в *C. simula*, которая, тем не менее, демонстрирует, что наибольшей усредненной токсичностью обладают животные, выловленные в заливе Хиросима Японского моря в конце июня и в период с конца июля по начало сентября [16]. Также было отмечено, что в 80% исследованных немертин токсичность в среднем составляла более 1000 МЕ/г, в 45% - более 2000 МЕ/г, а диапазон концентрации ТТХ и его аналогов в полученных экстрактах варьировался от 169 до 25590 МЕ/г. Интересно, что корреляции между токсичностью и массой тела животных не было установлено.

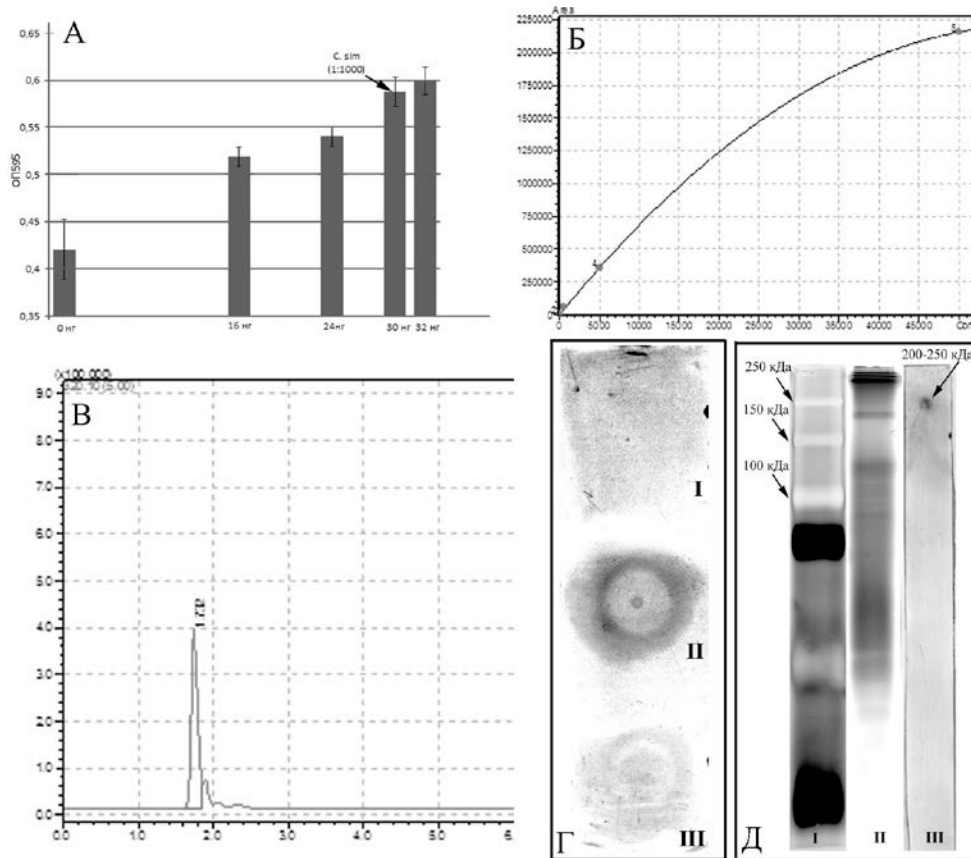


Рис. 1. Концентрация ТТХ-подобных токсинов (А, Б, В) и детекция ТТХ-положительных структур в белковых экстрактах немертину *C. simula* (Г, Д):

А – Биотесты на культуре мышинной нейробластомы Neuro-2a. Б – Калибровочный график для ТТХ концентрации 50нг – 50мг/мл. В – Хроматограмма экстракта *C. simula* по иону m/z 320.1. Г – Дот-блот: I – БСА, II – белковый препарат немертину *C. Simula*, III – обезлипиженный экстракт *C. simula*. Д – Нативный электрофорез в ПААГ с минимальным количеством ДСН белковых препаратов немертину *C. simula* в 10 % геле, окраска нитратом серебра: I – стандарты молекулярных масс, II – белковый препарат *C. simula*, 0,2 мг, III – иммуноблоттинг этого же препарата

Для идентификации ТТХ и оценки токсичности немертин *C. simula*, были использованы методы ВЭЖХ-МС в сочетании с биотестированием на культуре клеток нейробластомы Neuro-2. Стоит отметить, что биотесты на культуре клеток позволяют определить концентрацию не только ТТХ, но и других токсинов, блокирующих потенциал-чувствительные натриевые каналы (ПЧНК),

таких как сакситоксин, цилиндропермин, гуанотоксины I-IV и т.д., в то время как метод ВЭЖХ-МС детектирует только те токсины, для которых имеются тестовые стандартные образцы. В ходе биоиспытаний нами было показано, что экстракты *C. simula*, оказывают сильнейший эффект на культуру клеток, эквивалентный 30 нг ТТХ на 1/1000 часть экстракта, что соответствует

294 мкг/г тела животных или токсичности равной 1336 МЕ/г (рис. 1А). Методом ВЭЖХ-МС был определен только ТТХ, и его концентрация составила 100 мкг/г, что соответствует токсичности равной 445 МЕ/г (рис. 1Б, 1В). Суммируя полученные данные можно сказать, что кроме самого ТТХ в экстракте *C. simula* встречаются и другие ПЧНК-блокирующие токсины, концентрация которых эквивалента 196 мкг/г ТТХ. Для более точной качественной оценки токсинов гуанидинового ряда в экстракте *C. simula* необходимо провести дополнительные ВЭЖХ-МС анализы с использованием тестовых образцов на эти токсины.

В соответствие с ранее высказанной гипотезой о наличии у немертин *C. simula* специальных белков, обладающих ТТХ-связывающей активностью, дот-блот иммуноанализ позволил впервые установить наличие подобных соединений в немертинах. Нами было показано, что в экстрактах *C. simula*, полученных в ходе первичной очистки, а также в ходе дальнейшей очистки с использованием хлороформа для удаления липидов, присутствуют соединения, предположительно, белковой природы, обладающие способностью связывать ТТХ (рис. 1Г). Примечательно, что при использовании хлороформа для удаления липидов из экстрактов ТТХ-связывающая активность этих соединений заметно снижается, возможно, вследствие взаимодействия соединений с органическим растворителем. Известно, что характер связывания с токсином у ТТХ-связывающих белков достаточно variabelен и во многом зависит от условий экстракции белков. Матсуи с соавторами [13] показали, что белок из *Takifugu niphobles* теряет способность связывать ТТХ при добавлении даже небольших количеств уксусной кислоты до 0,05% и восстанавливает ее при нейтрализации. Йотсу-Ймашита с коллегами [17] выяснили, что связывание белка PSTBP из *T. pardalis* с [H]3STX — радиоактивно меченным структурным гомологом ТТХ — ингибируется на 20, 20, 60 и 80% в присутствии 10 мМ MgCl₂, CaCl₂, L-аргинина и креатина, соответственно. Нагашима с соавторами [18] продемонстрировали заметное ингибирующее влияние ряда детергентов, среди которых 1% додецилсульфат натрия, 1% дитеотриетол, 8М мочевины и 6М гуанидин гидрохлорид, на связывание ТТХ с белком из краба *Hemigrapsus sanguineus*.

Для подтверждения белковой природы обнаруженных веществ и для определения их молярной массы был использован метод нативного белкового электрофореза в полиакриламидном геле с минимальным количеством додецилсульфата натрия. Нами было показано, что ТТХ-связывающие белки из червя *C. simula*, которые являются первыми токсин-связывающими белками, обнаруженными в немертинах, обладают массой около 200-220 кДа (рис. 1Д).

Отсутствие каких-либо структурных данных о белках из *C. simula* не позволяет сравнить их с известными ТТХ-связывающими белками, однако данные о молекулярной массе дают возможность соотнести их с массой ранее исследованных соединений. Так, Матсуи с соавторами [13] впервые обнаружили в плазме крови *T. niphobles* ТТХ-связывающий белок, который обладает наименьшей массой среди остальных впоследствии выделенных белков — 116 кДа по данным ДСН-ПААГ-электрофореза и 91 кДа по данным масс-спектрометрии. Позже из плазмы крови *T. pardalis* Йотсу-Ймашита с коллегами [17] выделили димерный белок PSTBP, образованный двумя нековалентно связанными мономерами массой 104 кДа. Мономеры PSTBP представляют собой кислые гликопротеины (pI=5,0), которые состоят из белковой части массой 42 кДа и N-гликана массой 62 кДа. Гомологи PSTBP, обнаруженные у других видов фугу, отличаются, в основном, по составу и размеру N-гликана. В зависимости от вида животного молекулярные массы гомологов PSTBP варьируют в пределах от 105 кДа до 140 кДа. ТТХ-связывающие белки, выделенные из морских беспозвоночных, отличаются большими молекулярными массами, чем белки, выделенные из рыб фугу. Нагашима с соавторами [18] впервые обнаружили в гемолимфе краба *H. sanguineus* ТТХ-связывающий белок массой около 400 кДа. Белок представляет собой кислый гликопротеин (pI=3,5), состоящий, как минимум, из субъединиц двух типов — массой 72 кДа и 82 кДа. Из токсичных брюхоногих моллюсков *Natica lineata* Хванг с коллегами [19] выделили самый большой из известных ТТХ-связывающих белков массой около 400 кДа, состоящий из субъединиц двух типов — 272 кДа и 47 кДа, соответственно. Таким образом, установленная молекулярная масса белков из *C. simula* находится в диапазоне от 105 кДа у рыб *T. niphobles* до 400 кДа у морских беспозвоночных *H. sanguineus* и *N. lineata*.

Выводы: немертины *C. simula* содержат белки с молекулярной массой 200-220 кДа, обладающие ТТХ-связывающей активностью, и могут являться перспективным объектом для поиска природных антидотов против ТТХ и токсинов гуанидинового ряда.

Исследование выполнено при поддержке ДВФУ, проект №14-08-06-19 и программы фундаментальных научных исследований «Дальний Восток» №15-1-3-036.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Bane, V. Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection / V. Bane, M. Lehane, M. Dikshit et al. // Toxins. 2014. V. 6. P. 693-755.
2. Chulanetra, M. Toxic marine pufferfish in Thailand Seas and tetrodotoxin they contained / M. Chulanetra, N. Sookrung, P. Srimanote et al. // Toxins. 2011. V. 3. P. 1249-1262.

3. Sugita, H. Identification of a Tetrodotoxin producing Bacterium Isolated from the Xanthid Crab *Atergatis floridus* / H. Sugita, R. Ueda, T. Noguchi et al. // Nippon Suisan Gakkaishi. 1987. V. 53. № 5. P. 1693.
4. Noguchi, T. TTX accumulation in pufferfish—Review / T. Noguchi, O. Arakawa, T. Takatani // Comp. Biochem. Physiol. D 2006. V. 1. P. 145-152.
5. Chew, S. Anticholinesterase drugs in the treatment of tetrodotoxin poisoning / S. Chew, L. Chew, K. Wang et al. // Lancet. 1984. V. 2(8394). P. 108.
6. Xu, Q. Toxin-neutralizing effect and activity-quality relationship for mice tetrodotoxin-specific polyclonal antibodies / Q. Xu, C. Wei, K. Huang, K. Rong // Toxicology. 2005. V. 206(3). P. 439-448.
7. Noguchi, T. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication / T. Noguchi, O. Arakawa // Mar. Drugs. 2008. V. 6. № 2. P. 220-242.
8. Noguchi, T. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment / T. Noguchi, J.S.M. Ebesu // Toxin Rev. 2001. V. 20. P. 1-10.
9. Arakawa, A. Toxins of Pufferfish that Cause Human Intoxications. In Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea / A. Arakawa, D.-F. Hwang, S. Taniyama et al. // Terrapub and Nagasaki University: Tokyo, Japan, 2010. P. 227-244.
10. Kaneko, Y. TTX resistivity of Na⁺ channel in newt retinal neuron / Y. Kaneko, G. Matsumoto, Y. Hanyu // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 240. P. 651-656.
11. Maruta, S. Two critical residues in p-loop regions of pufferfish Na⁺ channels on TTX sensitivity / S. Maruta, K. Yamaoka, M. Yotsu-Yamashita // Toxicon. 2008. V. 51. P. 381-387.
12. Hwang, P.-A. Tetrodotoxin-binding proteins isolated from five species of toxic gastropods / P.-A. Hwang, Y.-H. Tsai, H.-P. Lin, D.-F. Hwang // Food Chem. 2007. V. 103. P. 1153-1158.
13. Matsui, T. Purification and some properties of a tetrodotoxin binding protein from the blood plasma of kusafugu, Takifugu niphobles / T. Matsui, K. Yamamori, K. Furukawa, M. Kono // Toxicon. 2000. V. 38. P. 463-468.
14. Yotsu-Yamashita, M. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel soluble saxitoxin and tetrodotoxin binding protein from plasma of the puffer fish, *Fugu pardalis* / M. Yotsu-Yamashita, A. Sugimoto, T. Terakawa et al. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 5937-5946.
15. Magarlamov, T.Yu. Distribution of tetrodotoxin in the ribbon worm *Lineus alborostratus* (Takakura, 1898) (nemertea): Immunoelectron and immunofluorescence studies / T.Yu. Magarlamov, O.A. Shokur, A.V. Chernyshev // Toxicon. 2016. V. 112. P. 29-34.
16. Asakawa, M. Highly toxic ribbon worm *Cephalothrix simula* containing tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan / M. Asakawa, K. Ito, H. Kajihara // Toxins (Basel). 2013. V. 5(2). P. 376-395.
17. Yotsu-Yamashita, M. Localization of pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP) in the tissues of the pufferfish, *Takifugu pardalis*, analyzed by immunohistochemical staining / M. Yotsu-Yamashita, N. Okoshi, K. Watanabe et al. // Toxicon. 2013. V. 72. P. 23-28.
18. Nagashima, Y. A tetrodotoxin-binding protein in the hemolymph of shore crab *Hemigrapsus sanguineus*: purification and properties / Y. Nagashima, K. Yamamoto, K. Shimakura, K. Shiomi // Toxicon. 2002. V. 40(6). P. 753-760.
19. Zhu, S. High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* spores in ground beef at elevated temperatures / S. Zhu, F. Naima, M. Marcotte // International Journal of Food Microbiology. 2008. V. 126. P. 86-92.

RESEARCH THE GUANIDINE TOXINS-BINDING PROTEINS IN A MARINE WORM CEPHALOTHRIX SIMULA: SEARCH OF PROMISSING ANTIDOTES FOR MARINE TOXINS

© 2016 A.E. Vlasenko¹, A.S. Krotov¹, E.A. Gorobets¹, T.Yu. Magarlamov²,
D.I. Melnikova¹, V.G. Kuznetsov¹

¹ School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok

²National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok

In the research for the first time discovered and studied protein compounds with the ability to bind powerful guanidine neurotoxins – tetrodotoxin-like substances, in a marine worm *Cephalothrix simula*. Using dot-blot immunoassay and protein electrophoresis toxin-binding activity of these compounds and their molecular weight of 200-220 kDa were identified.

Key words: *guanidine toxins, tetrodotoxin-binding proteins, neurotoxins, antidote*

Anna Vlasenko, Minor Research Fellow at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: vlasenko.ae.93@gmail.com; Anton Krotov, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: as_krotov94@mail.ru; Ekaterina Gorobets, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: gorobets.katrin@gmail.ru; Timur Magarlamov, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: biotimur@yandex.ru; Dariya Melnikova, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: dashkamelnikova93@gmail.com; Vasiliy Kuznetsov, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Biomedical Cells Technologies. E-mail: vas9i-kz@mail.ru