



УДК 615.919:591.145.2

**ОРИЕНТОТОКСИН — НОВЫЙ ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЙ НЕЙРОТОКСИН
ИЗ ЯДА БОЛЬШОГО ШЕРШНЯ *VESPA ORIENTALIS*****Туйчибаев М. У.***Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент***Ташмухамедов В. А.***Ташкентский государственный университет им. В. И. Ленина***Готгильф И. Г., Магазаник Л. Г.***Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград*

Из яда большого шершня *Vespa orientalis* выделен и охарактеризован новый пресинаптический нейротоксин с молекулярной массой 18 000. Этот нейротоксин, названный ориентотоксином, обладает выраженной лизофосфолипазной активностью и способен блокировать как вызванное, так и спонтанное выделение нейромедиатора из пресинаптической нервной мембраны.

Нейротоксины, влияющие на процессы выделения медиаторов из нервных окончаний, пока не могут быть использованы в качестве надежных маркеров конкретных мембранных структур, ответственных за нейросекрецию. Известные к настоящему времени пресинаптические нейротоксины, как правило, вызывают двух- или даже трехфазовое действие, что позволяет предполагать существование ряда последовательных стадий в механизме блокирования нервного импульса и нескольких молекулярных мишеней действия нейротоксинов [1].

Некоторые из этих нейротоксинов (нотексин, β -бунгаротоксин и др.) обладают фосфолипазной активностью, причем ферментативная атака на фосфолипиды мембран является если не главным, то достаточно важным сопутствующим компонентом их пресинаптического действия [2, 3]. Истинные биологические мишени других токсинов (бутулинического, столбнячного) в настоящее время не установлены; предполагается, что первичным рецептором этих токсинов являются углеводные остатки мембранных гликопротеинов [4, 5]. Все это затрудняет использование известных нейротоксинов в качестве инструментов исследования и побуждает к поискам новых пресинаптических токсинов.

Хорошо известно сильное токсическое действие яда ос, в частности яда одиночных ос, которые обездвигивают свои жертвы. В последние годы ведется интенсивное изучение нейротоксических компонентов яда ос [6, 7]. В 1982 г. было показано, что нейротоксин из яда шершня *Vespa mandarinia* (мандаротоксин) в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М вызывает блокирование передачи в нервно-мышечном препарате langуста [8]. Однако подлинной причиной блокирования передачи нервного импульса было нарушение генерации пресинаптического потенциала; никаких прямых доказательств поражения механизма нейросекреции в работе [8] приведено не было.

Продолжая исследования токсических компонентов яда перепончатокрылых, мы выделили из яда большого шершня *Vespa orientalis* индивидуальный белковый компонент, названный ориентотоксином, который, как показано в настоящей работе, обладает пресинаптическим действием на нервно-мышечные препараты лягушки.

При гель-фильтрации лиофилизованного яда большого шершня на се-

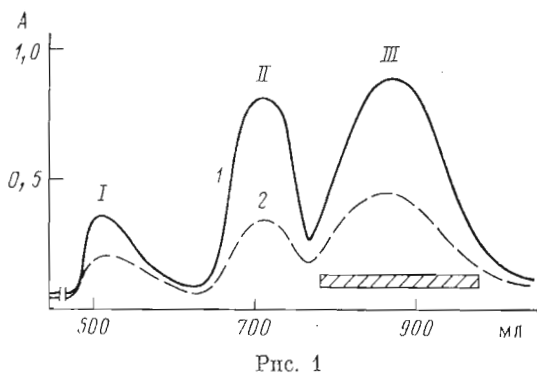


Рис. 1

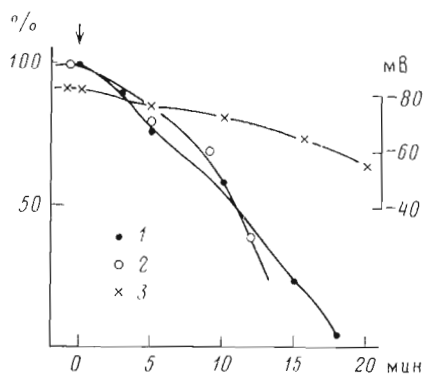


Рис. 3

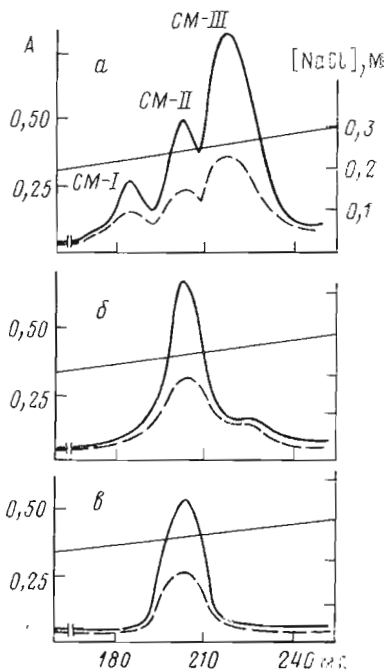


Рис. 2

Рис. 1. Гель-фильтрация цельного яда большого щерция на колонке (2,5×300 см) с сефадексом G-75. Элюцию проводили 0,1 М аммоний-форматным буфером, pH 4,5; скорость элюции 5 мл/ч на 1 см². I — поглощение при 278 нм, 2 — при 206 нм. Затрихована отбираемая фракция

Рис. 2. Хроматография фракции III (рис. 1) на колонке (1,0×30 см) с CM-целлюлозой CM-52 (а). Элюцию проводили 0,05 М трис-НСI-буфером, pH 7,6, в градиенте концентрации NaCl (0—0,3 М). б, в — рехроматография фракции CM-II в тех же условиях

Рис. 3. Кинетика пресинаптических изменений на нервно-мышечном препарате лягушки, вызванных действием $1,8 \cdot 10^{-8}$ М ориентотоксина. 1 — квантовый состав потенциалов концевой пластинки; 2 — частота спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки; 3 — мембранный потенциал мышечного волокна. Стрелкой указан момент добавления ориентотоксина

фадексе G-75 были получены три фракции; наиболее токсичной из них оказалась фракция III (рис. 1). Эта фракция, как было показано ранее [9, 10], обладает наибольшей фосфолипазной активностью. Дальнейшее разделение фракции III на карбоксиметилцеллюлозе (рис. 2) позволило выделить несколько фракций, как обладающих (фракция CM-III), так и не обладающих фосфолипазной активностью (фракция CM-II). Токсичность белков во фракциях CM-II и CM-III была примерно одинаковой (LD_{50} 0,50 и 0,65 мг/кг живого веса соответственно). После 2—5-кратной рехроматографии на карбоксиметилцеллюлозе (рис. 2) и обессоливания из фракции CM-II был выделен индивидуальный белок, не проявляющий фосфолипазной активности, — ориентотоксин. По данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и гель-фильтрации на сефадексе G-75, молекулярная масса исследуемого белка была равна 26 000—30 000, значение, вычисленное на основании данных аминокислотного состава, было несколько ниже (18 000). По данным аминокислотного анализа (табл. 1), молекула белка состоит из 150—160 аминокислотных остатков, в числе которых всего лишь пять остатков цистеина. Отсутствие свободных сульфгидрильных групп следовало из данных титрования образца реагентом Эллмана или *n*-хлормеркурибензоатом. N-Концевая аминокислотная последовательность карбоксиметилированного образца ориентотоксина, определенная автоматической деградацией

Аминокислотный состав ориентотоксина из яда
большого шершня

Аминокислота	Мол. %	Число остатков	Аминокислота	Мол. %	Число остатков
Cys (Cm)	3,25	5	Pe	6,69	10
Asx	11,28	17	Leu	7,40	11
Thr	6,91	10	Tyr	5,20	8
Ser	5,40	8	Phe	4,05	6
Glx	7,67	12	His	2,49	4
Pro	4,70	7	Lys	8,56	13
Gly	6,71	10	Arg	3,90	6
Ala	6,07	9	Trp	1,34	2
Val	7,64	12	Всего	100,30	152
Met	0,97	2			

Примечание. N-Концевая аминокислота — Phe, C-концевая — Lys.

Таблица 2

Изменение квантового состава потенциалов концевой
пластинки (ПКП) и частоты спонтанных миниатюрных
потенциалов концевой пластинки (МПКП) после контакта
нервно-мышечного синапса лягушки с $1,8 \cdot 10^{-8}$ М
ориентотоксином (в % к исходному уровню)

Время контак- та, мин	Квантовый состав ПКП	Частота МПКП
5	$65 \pm 7(4)$	$70 \pm 10(5)$
10	$58 \pm 6(4)$	$52 \pm 7(3)$

по Эдману, была гомологична N-концевой последовательности фосфолипазы A_2 из того же яда [10], но резко отличалась от аналогичной последовательности известных пресинаптических нейротоксинов из ядов змей [11–13]:

Фосфолипаза A_2 Phe-Asn-Pro-Cys-Pro-Tyr-Ser-Asp-Asp-Thr-Val-Lys-Met-Ile-Ile,
Ориентотоксин Phe-Asn-Pro-Cys-X-Tyr-Ser-Asp-X-Thr-Val-Lys-Met-Ile-Ile.

Поскольку компоненты яда насекомых могут содержать ферменты, обладающие различной специфичностью, было проведено исследование ферментативной специфичности ориентотоксина. Оказалось, что высокоочищенные препараты токсина не способны гидролизовать фосфолипиды (фосфатидилэхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, сфингомиелин и т. д.), но катализируют гидролиз 1-ациллизофосфолипидов (яичный 1-лизолецитин, 1-пальмитоиллизолецитин). Следовательно, ориентотоксин обладает выраженной лизофосфолипазной активностью.

Исследование нейротоксических свойств ориентотоксина на нервно-мышечном препарате лягушки показало, что этот токсин обладает достаточно сильным блокирующим действием. Начиная от концентрации $1,8 \cdot 10^{-8}$ М наблюдается постепенное снижение амплитуды вызванных потенциалов концевой пластинки (рис. 3, табл. 2). Способность блокировать как вызванное, так и спонтанное выделение медиатора при действии относительно низких концентраций токсина без фазы усиления процесса секреции выгодно отличает ориентотоксин от других известных пресинаптических нейротоксинов, выделенных из ядов различных животных. Повышение концентрации до $1,8 \cdot 10^{-7}$ и $1,8 \cdot 10^{-6}$ М существенно ускоряет исчезновение синаптических ответов, однако при этом наблюдается прогрессирующее снижение мембранного потенциала в регистрируемом мышечном волокне.

Изменение частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки и снижение уровня мембранного потенциала не предотвращалось добавлением к перфузируемому раствору тетродотоксина ($1 \cdot 10^{-6}$ г/мл), что свидетельствует против непосредственного активирующего действия ориентотоксина на потенциалчувствительные Na-каналы, блокируемые тетродо-

токсиком. Удаление из раствора ионов двухвалентных металлов (Ca^{2+} и Mg^{2+}) и добавление 1 мМ ЕГТА несколько усиливало токсический эффект ориентотоксина, в то время как α -латротоксин [14–15] и нейротоксины, обладающие фосфолипазной активностью [16], при этом полностью теряют способность к пресинаптическому действию. Следует отметить, что лизофосфолипазная активность исследуемого нами нейротоксина также мало зависела от экзогенного кальция.

Изменения мембранного потенциала, вызванные ориентотоксином, также имеют свои особенности. Прежде всего, скорость и вероятность их наступления, несомненно, связаны с повреждением клетки регистрирующим микроэлектродом. Так, при однократном измерении в группе волокон, подвергшихся контакту с ориентотоксином ($1,8 \cdot 10^{-8}$ М) в течение 60 мин, не было отмечено достоверных изменений мембранного потенциала, тогда как в волокнах, в которых регистрация велась непрерывно или путем нескольких проколов мембраны за период наблюдения, мембранный потенциал прогрессивно снижался. Можно полагать, что благодаря своей лизофосфолипазной активности ориентотоксин, возможно, обладает способностью модифицировать плазматическую мембрану, снижая ее устойчивость в условиях опыта. По-видимому, локальные механические повреждения мембраны мышечного волокна стимулируют эндогенную фосфолипазу мембран с выделением лизофосфолипидов, которые в свою очередь являются субстратом для лизофосфолипазы A_1 (ориентотоксина).

При сопоставлении эффектов ориентотоксина и мандаротоксина [8] обнаруживаются существенные различия в проявлении нейротоксического действия:

- а) ориентотоксин действует примерно в 50 раз сильнее;
- б) ориентотоксин, несомненно, нарушает процесс нейросекреции, тогда как мандаротоксин предположительно блокирует Na -каналы нервной терминали;
- в) ориентотоксин в отличие от мандаротоксина снижает уровень мембранного потенциала мышечных волокон.

Таким образом, в результате проведенных нами исследований из яда большого шершня *Vespa orientalis* выделен и охарактеризован новый пресинаптический нейротоксин — ориентотоксин, который может быть использован для исследования процессов передачи нервного возбуждения.

Экспериментальная часть

Яд большого шершня *Vespa orientalis* получен из рабочих особей методом электростимуляции [17].

Гель-фильтрацию лиофилизованного яда на сефадексе G-75 (Pharmacia, Швеция) проводили по методике, описанной ранее [9, 10] (рис. 1). Фракция III после проверки на фосфолипазную активность и острую токсичность на белых мышцах была лиофилизована и белковая смесь разделена хроматографией на колонке с СМ-целлюлозой СМ-52 (Whatman, Англия), уравновешенной 0,05 М трис- HCl -буфером, рН 7,6. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации (0,0–0,3 М) NaCl в том же буфере (рис. 2). После обессоливания на биогеле P-10 (Bio-Rad, США) в 0,1% уксусной кислоте из фракции СМ-II был выделен ориентотоксин, а из фракции СМ-III — фосфолипаза A_2 , физико-химические характеристики которой приведены в работах [9, 10]. Окончательную очистку ориентотоксина (освобождение от фосфолипазы A_2) осуществляли 2–3-кратной, в некоторых случаях 4–5-кратной рехроматографией на СМ-52 в описанных условиях. После обессоливания и лиофилизации ориентотоксин подвергался дальнейшему анализу.

Аминокислотный состав ориентотоксина и его карбоксиметилированно-го аналога после гидролиза 5,7 н. HCl (100° С, 24, 48 и 72 ч) определяли на анализаторе D-500 (Durrum, США); автоматический анализ N-концевой последовательности аминокислот проводили на секвенаторе 890 С (Beckman, США).

Молекулярную массу определяли с помощью стандартных методов геле-

фильтрации на сефадексе G-75 и диск-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, используя в качестве маркерных белков апамин, фосфолипазу A_2 из яда пчелы и среднеазиатской кобры, рибонуклеазу (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (Koch-Light, Англия) и лямботрипсиноген (Sprofa, Чехословакия).

Фосфолипазную и лизофосфолипазную активности определяли титрометрическим методом [10]. В качестве субстрата использовали яичный лецитин, 1,2-дипальмитоиллецитин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит (Koch-Light, Англия) (для фосфолипазной A_2 активности) и яичный 1-лизолецитин и синтетический 1-пальмитоиллизолецитин (Sigma, США) (для лизофосфолипазной активности).

Физиологическую активность ориентотоксина исследовали на изолированных нервно-мышечных препаратах лягушки общепринятыми методами [2]. Частоту и амплитуду спонтанных миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и квантовый состав вызванных стимуляцией нерва потенциалов концевой пластинки (ПКП) регистрировали с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Ориентотоксин в виде водного раствора вносили в ванночку с изолированным препаратом. Показатели функции нервно-мышечного синапса рассчитывали по отношению к контролю (до добавления ориентотоксина), принятому за 100%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Howard B. D., Gunderson C. B. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1980, v. 20, p. 307-336.
2. Magazanik L. G., Gotgilf I. M., Slaynova T. I., Miroshnikov A. I., Apsalon U. R. Toxicon, 1979, v. 17, № 5, p. 477-488.
3. Апсалон У. Р., Айанли А. Е., Мещерякова Е. А., Сурина Е. А., Мирошников А. И., Готгильф И. М., Магазаник Л. Г. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1068-1077.
4. Simpson L. L. Adv. Cytopharmacol., 1979, v. 3, № 1, p. 27-34.
5. Kryzbanovsky G. N. N. S. Arch. pharmacol., 1973, v. 276, № 2, p. 247-270.
6. Ederly H., Isay J., Gitter S., Joshua H. In: Arthropod venoms/Ed. Bettini S. Springer Berlin - Heidelberg - New York: 1978, p. 697-771.
7. Schmidt J. O. Ann. Rev. Entomol., 1982, v. 27, p. 339-368.
8. Abe T., Kawai N., Niwa A. Biochemistry, 1982, v. 21, № 7, p. 1693-1697.
9. Туйчибаев М. У., Муксимов Ф. А., Бабаев М., Рахимов М. М., Ташмухамедов Б. А. Биохимия, 1981, т. 46, № 7, с. 1215-1220.
10. Мирошников А. И., Грицук В. И., Мещеряков Е. А., Оганов В. В., Туйчибаев М. У., Ташмухамедов Б. А. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 494-501.
11. Fohman J., Lind P., Eaker D. FEBS Lett., 1977, v. 84, № 2, p. 367-371.
12. Kando K., Narita K., Lee Ch. Y. J. Biochem., 1978, v. 83, № 1, p. 101-115.
13. Halpert J., Eaker D. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 17, p. 6990-6997.
14. Misler S., Hurlbut W. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 5, p. 991-995.
15. Магазаник Л. Г., Славнова Т. И., Салихов Ш. И., Садыков А. С. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 2, с. 485-488.
16. Magazanik L. G., Slovnova T. I. Physiol. bohemoslovaca, 1978, v. 27, № 2, p. 421-429.
17. Туйчибаев М. У., Муксимов Ф. А., Ахмедова Н., Шкинев А. В., Мурходжаев У. З., Мурадова У. З., Алмагов К. Т., Рахимов М. М., Ташмухамедов Б. А. Биохимия, 1977, т. 42, № 12, с. 2160-2168.

Поступила в редакцию
27.VII.1983

ORIENTOTOXIN—A NOVEL PRESYNAPTICALLY ACTING NEUROTOXIN FROM THE VENOM OF GIANT HORNET *VESPA ORIENTALIS*

TUICHIBAEV M. U., TASHMUKHAMEDOV B. A., GOTGILF I. G.,
MAGAZANIK L. G.

*Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent;
V. I. Lenin State University, Tashkent; I. M. Sechenov Institute
of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Leningrad*

Orientotoxin, a novel presynaptically acting neurotoxin from the venom of giant hornet *Vespa orientalis*, has been isolated by gel filtration and ion exchange chromatography and characterized. The toxin has a molecular mass of 18 000. Highly purified preparations of orientotoxin possessed clearly manifested lysophospholipase activity and can block both induced and spontaneous release of neurotransmitter from the presynaptic nerve membrane.