



УДК 577.112:593.65

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЦИТОЛИЗИНЫ И ИНГИБИТОРЫ ТРИПСИНА ИЗ МОРСКОЙ АКТИНИИ *Radianthus macrodactylus*. ВЫДЕЛЕНИЕ И ЧАСТИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 1998 г. Т. А. Зыкова[#], М. М. Монастырская, О. В. Апаликова, Т. В. Швец, Э. П. КозловскаяТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 28.10.97 г. Принята к печати 30.03.98 г.

Из водного экстракта морской актинии *Radianthus macrodactylus* выделены два низкомолекулярных цитолизина (RmI и RmII) и четыре ингибитора трипсина. Метод очистки включает осаждение ацетоном, гель-фильтрацию на акрилексе П-4, ионообменную хроматографию на целлюлозе CM-32, аффинную хроматографию на трипсинсвязанной сефарозе 4В, ионообменную и обращенно-фазовую ВЭЖХ на Ultrapore Column TSK CM-3SW и Силасорб С₁₈ соответственно. Методом SDS-электрофореза в ПААГ определены молекулярные массы, равные 5100 Да для RmI и 6100 Да для RmII, а для ингибитора JnI – 7100 Да. Изоэлектрическая точка RmI 9.2, а RmII – 9.3. Оба белка не токсичны на мышах и крабах. Гемолитическая активность для RmI 25 НЕ/мг и для RmII 20 НЕ/мг, а их действие на эритроцитарную мембрану не ингибируется экзогенным сфингомиелином. RmI и RmII проявляют антигистаминную активность. Для RmI, RmII и ингибитора трипсина JnI определены аминокислотный состав и N-концевой аминокислотный остаток – глицин.

Ключевые слова: актиния, цитолизин, ингибитор трипсина, гемолитическая активность, антигистаминная активность.

Морские актинии – богатый источник биологически активных соединений белковой природы: нейро- и цитотоксинов (цитолизин), ферментов и ингибиторов протеиназ. Нейротоксины актиний – полипептиды с небольшими молекулярными массами от 3000 до 6000 Да [1–3], тогда как для цитолизинных молекулярная масса составляет 17000–20000 Да [4–6]. Единственный известный представитель высокомолекулярных цитолизинных актиний – метридиозин из *Metridium senile* с *M* 80000 Да [7, 8], а низкомолекулярных – теалиатоксин из актинии *Tealia felina* L. с *M* 7800 Да [9].

Показано, что цитолизинные актиний проявляют высокую гемолитическую активность в отношении мембран эритроцитов [4]. Их действие на биологические и модельные мембраны ингибируется экзогенным сфингомиелином, и поэтому они отнесены к группе сфингомиелинингибируемых цитолизинных. Действие метридиозина ингибируется холестеринем [7]. Этот токсин является представителем группы холестеринингибируемых цитолизинных и по физико-химическим свойствам подобен SH-активируемым бактериальным цитотоксинам [10].

При выделении токсинов из водных экстрактов актинии *Anemonia sulcata* Вандерер с соотр. впервые в 1976 г. обнаружил полипептиды, инги-

бирующие трипсин, химотрипсин, плазмин и калликреин [11]. Позже выделен ряд основных ингибиторов сериновых протеиназ с *M* 6000–7000 Да из других видов актиний [12–14].

Из актиний класса *Heteractis* (ранее *Radianthus*) выделены и охарактеризованы различные биологически активные полипептиды. Это цитолизин и ингибитор протеиназ из *Radianthus koseirensis* [13], нейротоксины из *R. paumotensis* [2], два цитолизинных из *Heteractis magnifica* (ранее *R. Ritteri*) [15], пять нейротоксинов [3], три цитолизина [6] и 10 ингибиторов протеиназ [16] из *R. macrodactylus*. Аминокислотная последовательность полипептидов этого класса актиний определена полностью для нейротоксина из *R. paumotensis* [2], для всей группы нейротоксинов и одного ингибитора протеиназ из *R. macrodactylus* [3, 17], для двух цитолизинных (магнификализина I и II) из *H. magnifica* [15] и частично – для цитолизина RTX-A из *R. macrodactylus* (неопубликованные данные).

В настоящей работе приводится метод выделения и очистки двух низкомолекулярных цитолизинных и ингибитора протеиназ из широко распространенной в Индийском океане морской актинии *R. macrodactylus*, а также представлены некоторые физико-химические характеристики этих полипептидов.

Цитолитические токсины в отличие от нейротоксинов экстрагируются из актиний водой. Для очистки цитолизинных на первой стадии в основ-

[#] Автор для переписки (тел.: (4-232) 31-16-51, e-mail: emma@piboc.marine.su).

Таблица 1. Схема очистки низкомолекулярных цитолизинов из актинии *Radianthus macrodactylus*

Стадия очистки	Суммарный белок, мг	Гемолитическая активность, НЕ/мг	Выход, %
Исходный водный экстракт	60000	1400	100
Осаждение 50% ацетоном	27500	135	45.8
Осаждение 80% ацетоном	30000	2500	50
Гель-фильтрация на акрилексе П-4	6150	5000	10
Ионообменная хроматография на целлюлозе СМ-32	440	400	0.6
Аффинная хроматография на трипсин-сефарозе 4В:			
цитолизин	176	2000	0.29
ингибиторы	220		0.37
ВЭЖХ на Ultraras Column TSK СМ-3SW:			
а	34	100	0.06
б	25	80	0.04
ВЭЖХ на Силасорб C_{18} :			
RmI	20	25	0.03
RmII	14	20	0.02

ном используют схему, предложенную Девлином и Бернхеймером [18, 19], которая включает в себя осаждение биологически активных полипептидов ацетоном или сульфатом аммония, лиофилизацию водных экстрактов и гель-фильтрацию на сефадексах или гидрофобную хроматографию на политетрафторэтилене (полихром-1) [6].

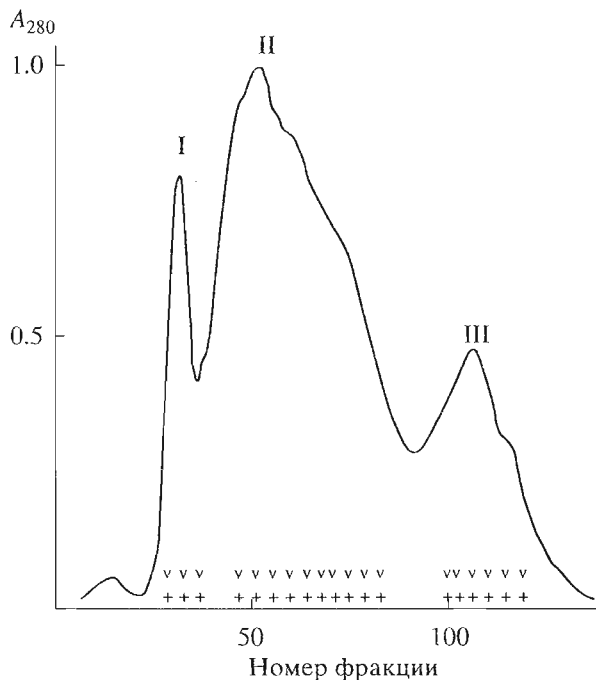


Рис. 1. Гель-фильтрация и обессоливание на акрилексе П-4 (2.2×40 см) активного препарата суммарных водорастворимых белков из актинии *R. macrodactylus* после осаждения 80% ацетоном. Скорость элюции 0.01 М аммоний-ацетатным буфером 5 мл/ч, объем фракций 4 мл. Здесь и на последующих рисунках (++) – фракция с гемолитической и (v v v) – трипсинингибирующей активностью. Отмечены отобранные фракции I, II и III.

Для очистки цитолизинов из *R. macrodactylus* использовали схему, представленную в табл. 1. Первоначально применили осаждение 50%, а затем 80% ацетоном. Максимальное содержание полипептидов с гемолитической активностью находилось в 80% фракции. Осаждение ацетоном позволило избавиться от основной части балластных белков, липидов и пигментов. Удаление морской соли, которая в значительных количествах присутствовала в ацетоновом порошке, было достигнуто одновременно с разделением полипептидов по молекулярной массе при последующей гель-фильтрации на акрилексе П-4 (рис. 1). В результате были получены три фракции (I–III) с гемолитической активностью, в которых также обнаружена трипсинингибирующая активность. Совместное присутствие токсинов и ингибиторов протеиназ неоднократно отмечено для многих видов актиний: *Anemonia sulcata* [20], *Actinia equina* [14], *Rhodactis rhodostoma*, *R. koseirensis* [13], *R. macrodactylus* [3, 17].

По результатам SDS-электрофореза (рис. 2) фракции I и II содержали белок с M 20000 Да, в то время как фракция III представлена в основном полипептидами с M 5000–7000 Да. Содержание последних оказалось невысоким. Поэтому для получения достаточного количества материала проводили 5 циклов хроматографии на акрилексе П-4. Лиофильно высушенную суммарную фракцию пика III хроматографировали на целлюлозе СМ-32 (рис. 3).

Вещества фракций 1–3 (рис. 3) проявляли гемолитическую и трипсинингибирующую активности, причем низкомолекулярные полипептиды находились во фракции 3. Совместное присутствие цитолизинов и ингибиторов трипсина в одних и тех же фракциях свидетельствует об их близких физико-химических характеристиках. Для разделения цитолизинов и ингибиторов протеиназ, содержащихся во фракции 3, использовали метод аффинной

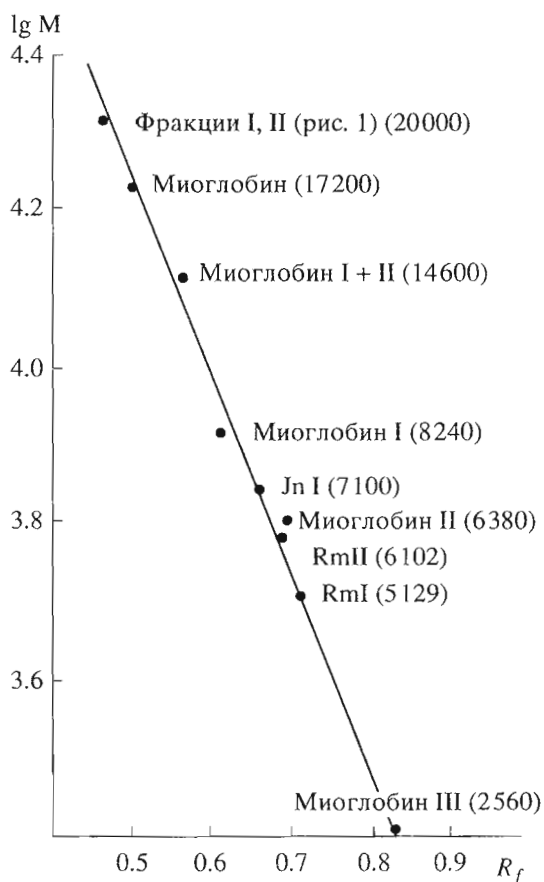


Рис. 2. Определение молекулярной массы белков фракций I и II, а также гомогенных препаратов RmI, RmII и JnI по результатам SDS-электрофореза. В скобках приведены молекулярные массы (Да) белков-маркеров и анализируемых препаратов.

хроматографии на трипсинсвязанной сефарозе 4В (рис. 4). Фракция А (рис. 4) содержала полипептиды с M 5000–6000 Да, проявляющие только гемолитическую активность, а фракция Б – полипептиды с M 7000 Да, показавшие трипсинингибирующую активность.

В результате гель-фильтрации фракции Б на сефадексе G-15 выделены четыре ингибитора трипсина (фракции 1–4, рис. 5). Для одного из них, JnI (фракция 1), определен аминокислотный состав и молекулярная масса, значения которых близки к аналогичным характеристикам ингибитора протеиназ из актинии *R. rhodostoma* [13] и четырех ингибиторов из актинии *A. equina* [14] (табл. 2).

Низкомолекулярные цитоллизины RmI и RmII были очищены ВЭЖХ: ионообменной на Ultrac Column TSK CM-3SW (рис. 6) и обращенно-фазовой на Силасорб С18 (рис. 7). Их чистота доказана методом SDS-электрофореза и анализом N-концевого аминокислотного остатка. Молекулярная масса RmI и RmII, по данным SDS-электрофореза, – 5100 и 6100 Да соответственно (рис. 2).

Для обоих цитоллизинов определен аминокислотный состав и изоэлектрическая точка. Физико-химические характеристики приведены в табл. 3. Молекулярная масса RmI и RmII, рассчитанная из аминокислотного состава, составляет

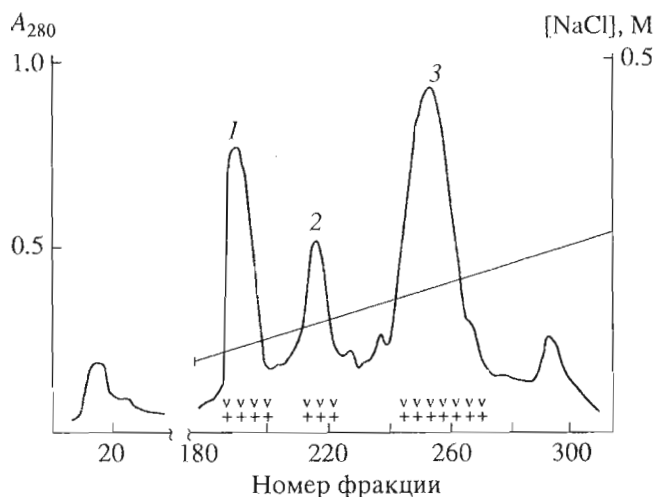


Рис. 3. Ионообменная хроматография полипептидов пика 3 (рис. 1) на колонке (1.2 × 50 см) с целлюлозой CM-32 в градиенте концентрации хлористого натрия в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6.0 (3000 мл). Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракций 6 мл. Отмечены отобранные фракции 1, 2 и 3.

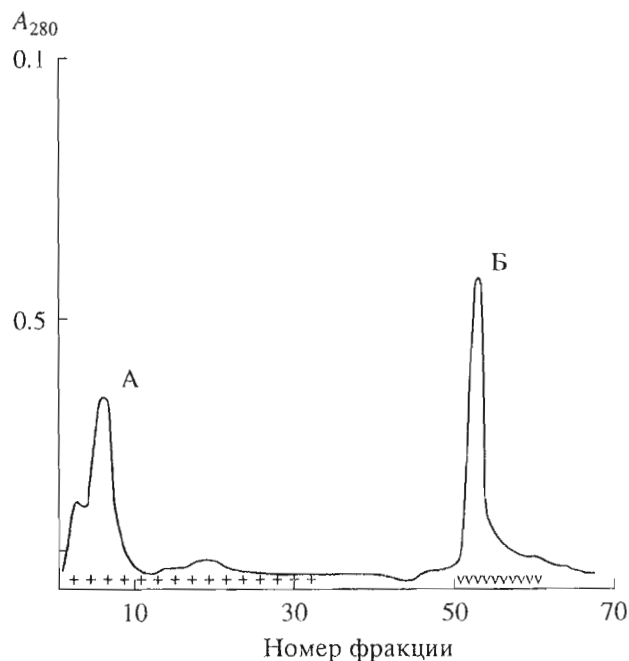


Рис. 4. Аффинная хроматография пика 3 (рис. 3) на колонке (1.5 × 12 см) с трипсин-сефарозой 4В. Фракция А элюируется 0.1 М аммоний-ацетатным буфером, pH 4.0, содержащим 0.3 М NaCl и 0.01 М CaCl₂, а фракция Б – 0.1 М HCl, содержащим 0.5 М NaCl и 0.01 М CaCl₂ (pH 1.2). Скорость элюции 120 мл/ч, объем фракций 3 мл. Отмечены отобранные фракции А и Б.

Таблица 2. Аминокислотный состав ингибиторов из *R. macrodactylus* (JnI), *R. rhodostoma* [13] и *Actinia equina* [14]

Аминокислота	<i>R. macrodactylus</i>	<i>R. rhodostoma</i>	<i>A. equina</i>			
			АЕПИ-I	АЕПИ-II	АЕПИ-III	АЕПИ-IV
Asx	7	5	6	5	7	6
Txr	3	1	3	3	3	3
Ser	3	2	2	3	1	1
Glx	5	4	6	5	4	5
Pro	3	2	3	3	3	3
Gly	9	6	6	6	7	6
Ala	4	2	4	4	3	4
1/2Cys	+	4	4	4	5	5
Val	3	3	2	2	2	2
Met	0	0	0	0	0	0
Ile	4	2	1	1	1	1
Leu	4	2	1	1	1	1
Tyr	2	3	4	3	4	4
Phe	3	3	3	4	5	4
Lys	3	3	2	2	2	1
His	1	1	1	2	1	1
Arg	5	5	4	4	5	6
Trp	0	0	0	0	0	0
Количество остатков	59	48	55	54	54	53
<i>M</i> исходя из аминокислотного состава, Да	6304	5459	6322	6304	6804	6494
<i>M</i> по данным SDS-электрофореза, Да	7100	—	6200	6700	6200	7000

Таблица 3. Аминокислотный состав и некоторые физико-химические свойства цитолизинов RmI и RmII из актинии *R. macrodactylus* и теалиатоксина из *Tealia felina* [9]

Аминокислота	RmI	RmII	Теалиатоксин	Аминокислота	RmI	RmII	Теалиатоксин
Asp	3	4	6–7	Phe	3	3	2
Thr	2	3	4–5	Lys	4	4	3
Ser	2	2	8	His	2	1	1
Glx	4	5	5–6	Arg	4	5	2
Pro	3	2	1	Trp	0	0	Не опр.
Gly	6	8	10	Количество	48	55	59–63
Ala	3	3	4	остатков			
Cys(Cm)	4	4	Не опр.	N-Концевая	Gly	Gly	Блокирована
Val	2	3	3	<i>M</i> (по данным SDS-электрофореза), Да	5100	6100	7800
Met	0	0	1	<i>M</i> (из аминокислотного состава), Да	5857	6496	7300
Ile	3	5	3	<i>pI</i>	9.2	9.3	9.0
Leu	2	2	4				
Tyr	1	1	2–3				

5857 и 6496 Да соответственно. Отличительной чертой аминокислотного состава обоих полипептидов является отсутствие остатков триптофана и метионина, наличие большого количества заряженных аминокислотных остатков и 4 остатков цистеина, что предполагает наличие двух внутримолекулярных дисульфидных связей.

Данные по биологической активности RmI и RmII и высокомолекулярных цитолизин [6, 13, 15], приведенные в табл. 4, свидетельствуют о зна-

чительных различиях между двумя группами цитолизин. Низкомолекулярные *Radianthus*-цитолизин RmI и RmII в отличие от высокомолекулярных не токсичны для мышей и крабов, а их гемолитическая активность на три порядка ниже активности высокомолекулярных цитотоксинов. Показано, что преинкубация RmI и RmII с дисперсией экзогенного сфингомиелина не уменьшает исходную гемолитическую активность цитолизин. Принято считать, что сфингомиелин является мем-

Таблица 4. Биологическая активность цитолизинов из *R. macrodactylus* и некоторых цитолизинов из актиний класса *Heteractis*

Актиния/токсин	M, Да	Токсичность, мг/кг		Гемолитическая активность, НЕ/мг	Ингибирование сфингомиелином
		на мышцах	на крабах		
<i>R. koseirensis</i> [13]	10000	>20	2.0 на рыбках <i>Poecilia reticulata</i>	0.75 мкг/мл	+
<i>H. magnifica</i> (ранее <i>R. Ritteri</i>) [15]					
магнификализин I	19000	0.14		36000	+
магнификализин II	19000	0.32		33000	+
<i>R. macrodactylus</i> [6]					
RTX-A	20000	0.005	4.5	35000	+
RTX-S	20000	0.005	14.3	50000	+
RTX-G	20000	0.01	2.4	10000	+
RmI	5100	>10.0	13.0	25	-
RmII	6100	>10.0	16.0	20	-

Таблица 5. Антигистаминная активность цитолизинов из актинии *R. macrodactylus* (RmI + RmII)

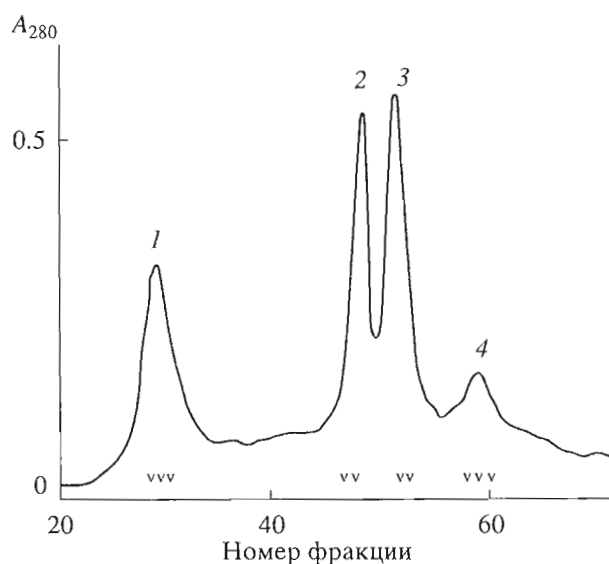
Концентрация дигидрохлорида гистамина, вызывающая "микрошок", в/в, мг/г	RmI + RmII (1 : 1), в/в, мг/г	Латентный период развития "микрошока", мин	Десенсибилизационный период, мин
0.02	-	2 ± 0.1	90 ± 2
0.02	0.006	3 ± 0.1	60 ± 1
0.02	0.020	8 ± 0.3	30 ± 2

бренным акцептором высокомолекулярных цитолитических токсинов актиний [4, 21] и участвует в специфическом связывании цитолизинов с липидным матриксом биологических мембран [22]. Таким образом, выделенные нами низкомолекулярные цитолизины, по-видимому, имеют отличный от высокомолекулярных механизм мембранотропного действия.

Ранее из актинии *T. felina* L. был выделен цитолитический токсин с M 7800 Да (теалиатоксин), обладающий гистаминолитической активностью [9], наличие которой у цитолизинов морских актиний было обнаружено впервые. Сравнение физико-химических характеристик теалиатоксина с аналогичными характеристиками RmI и RmII (молекулярная масса, аминокислотный состав, изоэлектрическая точка) выявило их сходство (табл. 3). В связи с этим проведены испытания цитолизинов RmI и RmII на наличие антигистаминной активности по методу [23]. К сожалению, мы располагали небольшим количеством цитолизинов и поэтому использовали в экспериментах их смесь (в соотношении 1 : 1), так как незначительные различия в аминокислотном составе, значениях молекулярной массы и гемолитической активности, по нашему мнению, позволяют предполагать наличие антигистаминной активности у обоих белков. После совместного введения суммы цитолизинов и гистамина наблюдали увеличение латентного периода развития "микрошока" и уменьшение времени десенсибилизации животных по сравне-

нию с контрольной группой (табл. 5). Результаты биоиспытаний свидетельствуют о наличии антигистаминной активности у цитолизинов.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение структурно-функциональных взаимосвязей в группе низкомолекулярных цитолитических токсинов морской актинии *R. macrodactylus*.

**Рис. 5.** Гель-фильтрация фракции Б (рис. 4) на колонке (1.5 × 95 см) с сефадексом G-15. Элюцию проводили водой со скоростью 18 мл/ч, объем фракций 2 мл. Фракция 1 соответствует ингибитору трипсина JnI.

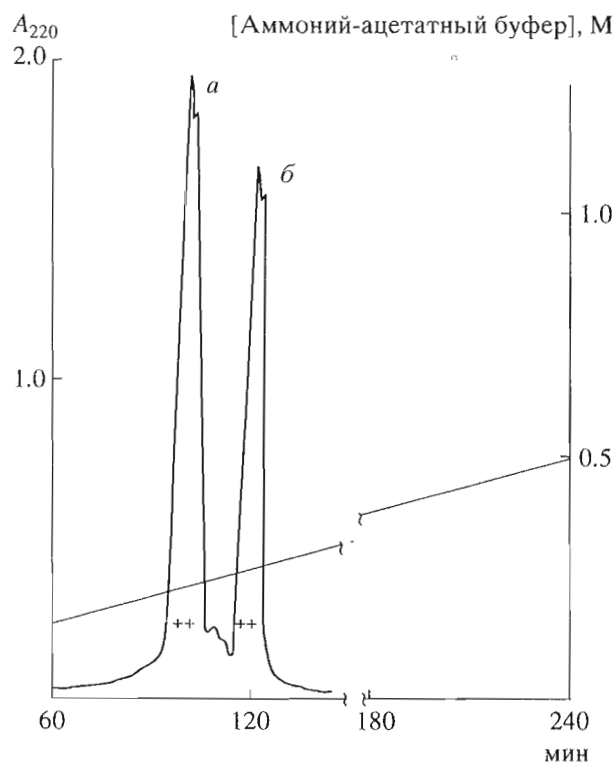


Рис. 6. Ионобменная ВЭЖХ фракции А (рис. 4) на колонке (21.5 × 150 мм) Ultropac Column TSK CM-3SW в градиенте концентрации молярности аммоний-ацетатного буфера (0.1–1 М), рН 6.0, за 240 мин. Скорость элюции 1 мл/мин.

lus, а также механизма антигистаминного действия этих полипептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акрилекс П-4, сефадекс G-15 и сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), карбоксиметилцеллюлозу-32 (Whatman, Англия), полихром-1 (Олайн, Латвия), трипсин (Worthington, США), 5-диметиламинонафталин-1-сульфохлорид (дансилхлорид) и реактивы для электрофореза (Serva, ФРГ), *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*D,L*-аргинина и сфингомиелин (Sigma, США).

Осаждение ацетоном суммарных водорастворимых белков. 1 кг перемолотых актиний заливали 4 л воды, экстрагировали 12 ч при 4°C, затем центрифугировали 2 ч при 3000 об/мин.

а) Осаждение 50% ацетоном выполняли путем добавления 300 мл охлажденного до -20°C ацетона к 300 мл холодного супернатанта. При добавлении ацетона экстракт медленно перемешивали, а затем 15 мин выдерживали на холоду. Осадок отделяли центрифугированием при 4000 об/мин (10 мин);

б) осаждение 80% ацетоном выполняли добавлением к 540 мл полученного супернатанта 180 мл охлажденного ацетона. После центрифугирования

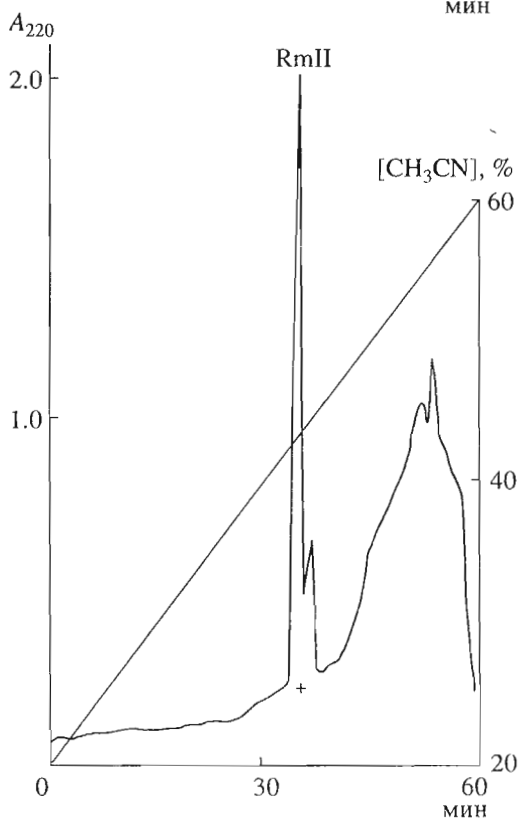
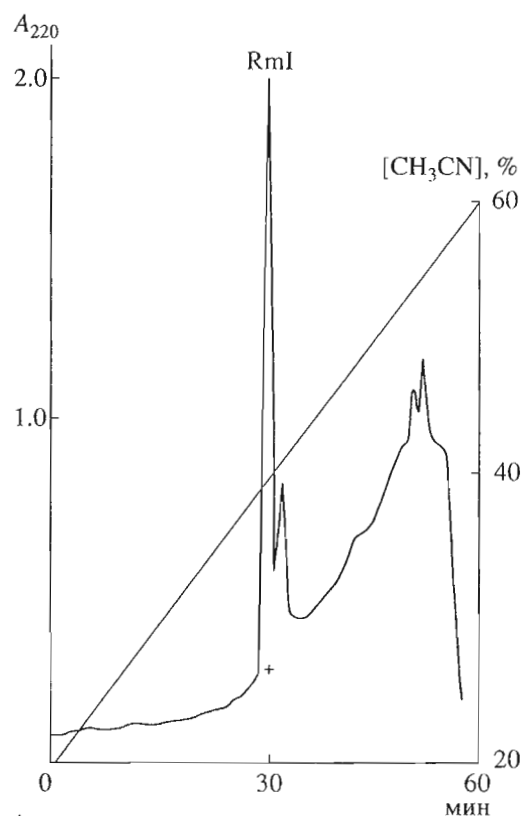


Рис. 7. Обращенно-фазовая ВЭЖХ пиков а и б (рис. 6) на колонке (10 × 250 мм) Силасорб С₁₈. Элюция 0.1% трифторуксусной кислотой в градиенте концентрации ацетонитрила (0–60%) за 60 мин. Скорость элюции 1 мл/мин.

осадок сушили 8–12 ч в вакууме над хлоридом кальция.

Обессоливание и гель-фильтрацию растворенного в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6.0, ацетонового порошка после центрифугирования и удаления нерастворимого осадка проводили на колонке (2.2 × 40 см) с акрилексом П-4, уравновешенным тем же буфером. Активные фракции объединяли и лиофилизовали.

Ионообменную хроматографию (рис. 3) проводили на колонке (2.2 × 50 см) с целлюлозой СМ-32 в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М) в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, рН 6.0. Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 6 мл.

Аффинную хроматографию (рис. 4) проводили на активированной трипсином сефарозе согласно [24]. Лиофильно высушенные фракции А и Б обессоливали на колонках с акрилексом П-4 и полихромом-1 соответственно (рисунки не приводятся). Гемолизины фракции А элюировали водой, а ингибиторы фракции Б элюировали с полихрома 40% этанолом.

Гель-фильтрацию на сефадексе G-15 (колонка 1.5 × 95 см) проводили, элюируя активные фракции водой со скоростью 18 мл/ч. Объем фракций 5 мл.

ВЭЖХ осуществляли с помощью прибора фирмы Beckman (США) на колонках Ultropac Column TSK CM-3SW фирмы LKB (Швеция) и Силасорб С₁₈ фирмы “Элсико” (НПО “Диагностикум”, Россия).

Гемолитическую активность определяли на эритроцитах мыши в среде, содержащей 0.9% NaCl, 1 мМ KCl, 10 мМ глюкозы, 5 мМ трис-НСl, рН 7.4. Уровень гемоглобина определяли в супернатанте спектрофотометрически при 540 нм после предварительного быстрого охлаждения реакционной смеси и ее центрифугирования для осаждения эритроцитов и их теней. За одну гемолитическую единицу (HE) принимали количество белка, вызывающее 50% гемолиз в 1 мл 0.7% суспензии эритроцитов за 30 мин при 37°C.

Ингибирующее действие сфингомиелина определяли по методу Бернхеймера [19], предварительно инкубируя цитотоксины RmI и RmII (6 HE) с дисперсией сфингомиелина в молярном соотношении 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 50, 1 : 100 в течение 60 мин. Степень гемолиза добавленных к липид-белковой смеси эритроцитов определяли спектрофотометрически при 540 нм по поглощению супернатанта, полученного после центрифугирования суспензии эритроцитов.

Активность ингибиторов трипсина определяли, используя субстрат трипсина *N*-бензоил-*D,L*-аргинина *n*-нитроанилид (BAPNA): 40 мг субстрата растворяли в 1 мл диметилформамида, доводили объем раствора до 50 мл водой. К 50 мкл раствора ингибитора добавляли 200 мкл раствора трипсина (10 мкг/1 мл 0.001 М HCl) и 1 мл 0.1 М Трис-НСl, рН 8.1. После преинкубации в течение

5 мин при комнатной температуре добавляли 1 мл раствора BAPNA. Количество образовавшегося *n*-нитроанилина определяли спектрофотометрически при 410 нм. Измерение проводили относительно контрольного образца, который содержал субстрат, денатурированный фермент и ингибитор в соответствующем разбавлении.

SDS-электрофорез проводили по методу Лэммли [25] в вертикальных пластинах (9 × 12 см × 1 мм) 15% ПААГ в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия. В качестве стандартов использовали белки-фрагменты миоглобина: миоглобин (17200 Да), миоглобин I + II (14600 Да), миоглобин I (8240 Да), миоглобин II (6380 Да), миоглобин III (2056 Да) (набор Pharmacia, Fine Chemicals AB, США).

Изоэлектрическую точку гемолизинов определяли по методу [19] на стандартной пластинке (11 × 15 см) с полиакриламидным гелем, содержащим 2% смесь амфолинов с рН 2.0–10.0 (LKB, Швеция). Значения рН определяли с помощью рН-метра типа 501 (Orion Research, США).

Карбоксиметилирование белков осуществляли по методу [26]. Обессоливание полученных препаратов проводили на затемненной колонке с биогеелем П-2.

Аминокислотный анализ осуществляли по методу [27] на аминокислотном анализаторе D-500 (Durrum, США). Цистеин определяли в виде карбоксиметилцистеина – Cys(Cm).

Триптофан определяли спектрофотометрически на приборе Cary 219 (Varian, Англия) по вторым производным УФ-спектров белков [28].

N-Концевые аминокислоты определяли по методу [29]. Дансильные производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках (5 × 5 см) с закрепленным слоем силикагеля [30].

Токсичность определяли на белых беспородных мышцах весом 20–22 г инъекцией внутрибрюшинно и на прибрежных морских крабах *Hemigrapsus penicillatus* весом 14–20 г инъекцией между телом и ногой.

Антигистаминную активность определяли по методу [23] на белых беспородных крысах-самцах весом 52 ± 2 г (по 5 животных в группе), используя 0.1% раствор дигидрохлорида гистамина в физиологическом растворе. Контрольная группа животных получала гистамин, вызывающий микрошок в течение 2 мин. Состояние микрошока характеризовалось усилением дыхательных движений брюшной стенки животного, последующим участием всех мышц тела в дыхательном процессе и быстрым движением головы вперед-назад. Раствор смеси RmI и RmII (в соотношении 1 : 1) вводили животным внутривенно в дозах от 0.1 до 1 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schweitz H., Vincent J.-P., Barhanin J., Frelin C., Linden G., Hugues M., Lazdunski M. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 5245–5252.

2. Schweitz H., Bidard J.N., Frelin C., Pauron D., Vijverberg H.P.M., Mahasneh D.M., Lazdunski M., Vilhois F., Tsugita A. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 3554–3561.
3. Зыкова Т.А., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. // *Биоорганическая химия*. 1988. Т. 14. С. 1489–1494.
4. Turk T. // *J. Toxicol.-Toxin Rev.* 1991. V. 10. P. 223–262.
5. Norton R.S., Macek P., Reid G.E., Simpson R.J. // *Toxicol.* 1992. V. 30. P. 13–23.
6. Монастырская М.М. Гемолизины морских актиний *Radianthus macrodactylus* и *Metridium senile*: выделение, свойства и механизм действия. Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, ТИБОХ ДВО РАН, 1988.
7. Bernheimer A.W., Avigad L.S., Kim K.S. // *Toxicol.* 1979. V. 17. P. 69–75.
8. Монастырская М.М., Козловская Э.П., Иванов А.С., Мольнар А.А., Халилов Э.М., Еляков Г.Б. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. С. 830–835.
9. Elliott R.C., Konya R.S., Vickneshwara K. // *Toxicol.* 1986. V. 24. P. 117–122.
10. Bernheimer A.W. // *Marin Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology* / Eds S. Hall, G. Strichartz. Washington DC: A.T.S. Symp. Ser. 418, Am. Chem. Soc., 1990. P. 304–311.
11. Wunderer G., Beress L., Machleidt W., Fritz H. // *Methods Enzymol.* 1976. V. 45. P. 881–885.
12. Fritz H., Brey B., Beress L. // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1972. V. 353. P. 19–30.
13. Mebs D., Liebrich M., Reul A., Samejima Y. // *Toxicol.* 1983. V. 21. P. 257–264.
14. Shiomi K., Ishikawa M., Yamanaka H., Kikuchi T. // *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1989. V. 55. P. 1235–1241.
15. Khoo K.S., Kam W.K., Khoo H.E., Gopalakrishnakone P., Chung M.C.M. // *Toxicol.* 1993. V. 31. P. 1567–1579.
16. Зыкова Т.А. Исследование первичной структуры активных пептидов актинии *Radianthus macrodactylus*. Дис. канд. хим. наук. Владивосток, ТИБОХ ДВО РАН. 1987.
17. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. С. 293–301.
18. Devlin J.P. // *J. Pharm. Sci.* 1974. V. 63. P. 14578–14800.
19. Bernheimer A.W., Avigad L.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. P. 467–471.
20. Wunderer G., Machleidt W., Fritz H. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 80. P. 816–820.
21. Иванов А.С., Мольнар А.А., Козловская Э.П., Монастырская М.М. // *Биол. мембраны*. 1987. Т. 4. С. 243–248.
22. Shnyrov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P. // *Biochem. Int.* 1992. V. 26. P. 219–229.
23. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. М.: Медицина, 1979. С. 75.
24. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1968. V. 61. P. 636.
25. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
26. Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. С. 302–310.
27. Scheffer J.-J., Tsugita A., Linden G., Schweitz H., Lazdunski M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 107. P. 272–278.
28. Ichikawa T., Terada H. // *Chem. Pharm. Bull.* 1981. V. 29. P. 438–444.
29. Grey W.R. // *Methods Enzymol.* 1967. V. 11. P. 139–151.
30. Бельский Б.Г., Ганкина Е.С., Нестеров В.В. // *Докл. АН СССР*. 1967. Т. 172. С. 91–93.

Low-Molecular Cytolytic Toxins and Trypsin Inhibitors from Sea Anemone *Radianthus macrodactylus*: Isolation and Partial Characterization

T. A. Zyкова[#], M. M. Monastyrnaya, O. V. Apalikova, T. V. Shwets, and E. P. Kozlovskaya

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences, pr. 100-letia Vladivostoka, 159, Vladivostok, 690022 Russia

Two low-molecular cytolytic toxins (RmI and RmII) and four trypsin inhibitors were isolated from the aqueous extract of sea anemone *Radianthus macrodactylus*. The method of isolation involved precipitation with acetone, gel filtration on acrylex P-4, ion-exchange chromatography on CM-32 cellulose, affinity chromatography on trypsin-binding sepharose 4B, ion exchange chromatography on an Ultrapore TSK CM-3SW column, and reversed phase HPLC on a Silasorb C₁₈ column. RmI, RmII, and JnI inhibitor displayed molecular masses 5100, 6100, and 7100 Da, respectively, when subjected to SDS-PAGE. The isoelectric points were 9.2 and 9.3 for RmI and RmII, respectively. The amino acid composition and N-terminal amino acid residue (glycine) were determined for RmI, RmII, and JnI. Both proteins were nontoxic to mice and crabs. Hemolytic activity was determined to be 25 and 20 HU/mg for RmI and RmII, respectively, and their action on erythrocyte membrane was not inhibited by exogenous sphingomyelin. RmI and RmII exhibited antihistamine activity.

Key words: sea anemone, cytolytic toxin, trypsin inhibitor, hemolytic activity, antihistamine activity

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 31-1651; e-mail: emma@piboc.marine.su.