

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ КАК ОСМОТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ РЫБ НА ПРИМЕРЕ ТРЕСКИ АТЛАНТИЧЕСКОЙ *GADUS MORHUA*

З. М. Базарова¹, М. А. Константинов², А. С. Васильев¹, И. Ю. Торопыгин^{1,2}, А. М. Андреева^{1,*}

¹ Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Россия, e-mail: *aam@ibiw.ru

² Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10
Поступила в редакцию 25.04.2025

В данной работе рассматриваются функции ингибиторов протеиназ в плазме крови трески атлантической *Gadus morhua* с помощью терминов генной онтологии (Gene Ontology) и литературных источников, включая работы авторов исследования. Обсуждаются основные свойства ингибиторов протеиназ, механизмы их действия и влияние на различные физиологические процессы.

Ключевые слова: ингибиторы протеиназ, атлантическая треска, сыворотка крови, осмотически активные белки, электрофорез, MALDI, генная онтология.

DOI: 10.47021/0320-3557-2025-44-52

ВВЕДЕНИЕ

В группе Pisces, а именно, у костистых рыб (Teleostei), в ходе третьей полногеномной дубликации был “утрачен” ряд генов, в их числе ген сывороточного альбумина [Ohno, 1970; Noel et al., 2010; Braasch et al., 2016; Pasquier et al., 2016]. Исключением стали низшие костистые — щуковые (Esocidae) (NCBI: 105008514, 105014523), лососевые (Salmonidae) (NCBI: 106570911 и др.) и аравановые (Osteoglossidae) (NCBI: 108938050), сохранившие этот ген [Nynca et al., 2017]. Потеря альбумина у значительной части костнопузырных Ostariophysi и колючеперых Acanthopterygii рыб не имела негативных последствий; они освоили разнообразные по солености акватории, что указывает на их эффективные механизмы поддержания осмотического гомеостаза [Andreeva, 2022]. Разработанная на примере карповых рыб “безальбуминовая” гипотеза капиллярного обмена [Andreeva, 2020, 2021] объясняет этот феномен тем, что осмотическую функцию сывороточного альбумина у безальбуминовых рыб взяли

на себя множественные белки с высокой осмотической активностью (осмотически активные белки, ОАБ) [Andreeva et al., 2023] из разных функциональных классов: гемопексины, аполипопротеины (в составе липопротеинов высокой плотности) и ингибиторы протеиназ (ИП). Белки этих классов обнаружены и среди ОАБ атлантической трески *Gadus morhua* [Базарова и др., 2022, 2024 (Bazarova et al., 2022, 2024)].

В данной работе рассмотрены основные функции ингибиторов протеиназ, а также их способность к замещению осмотической функции утраченного в ходе эволюции альбумина у безальбуминовых рыб в формате “безальбуминовой” модели. Цель работы — анализ функций сывороточных ингибиторов протеиназ у трески атлантической *Gadus morhua* с помощью аннотаций генной онтологии (Gene Ontology) и литературных источников, включая данные авторов исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является треска атлантическая *Gadus morhua* (Teleostei, Paracanthopterygii, Gadiformes, Gadidae). В работе использовали образец сыворотки крови от одного экземпляра (общая выборка 12 экз.): самец; II стадия зрелости гонад. Рыб отлавливали в июне в районе мыса Картеш, Белое море. Показатели длины ad и ab по Смиту варьировали от 16.5 до 29.5 см и от 18.0 до 32.5 см соответственно.

Получение крови и сыворотки крови. Для получения крови использовали каудотомию. Для получения сыворотки пробирку с кровью выдерживали в холодильнике при 4°C в течение

6–8 ч, после чего жидкость над сгустком осторожно отбирали пипеткой, переносили в чистую пластиковую пробирку и использовали для электрофореза.

Электрофорез. Для разделения белков сыворотки крови использовали двумерный SDS-электрофорез в полиакриламидном геле (2D-SDS-PAGE) с диск-электрофорезом (диск-Е) в первом направлении [Andreeva et al., 2023]. Границы фракции белков с высокой осмотической активностью (ОАБ) определяли по навигатору трансферрину (Tf) в диск-Е: ОАБ располагались в анодной области относительно Tf. В SDS-PAGE фракция из ОАБ располагалась

в правом поле относительно Tf. Расчет молекулярной массы ОАБ (Mr) проводили в SDS-PAGE с помощью программы ONE-Dscan Ver 1.31 (Scananalytic Inc.) с использованием маркеров в составе набора PageRulerTM Prestained Protein Ladder Plus (10, 17, 28, 36, 55, 72, 95, 130, 250 kDa) (Fermentas, США).

Идентификация белков с помощью масс-спектрометрии MALDI. MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрию выполняли на MALDI — времяпролетном масс-спектрометре с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных

ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с калибровкой их по известным пикам аутолиза трипсина [Базарова и др., 2024 (Bazarova et al., 2024)].

Анализ функций ингибиторов протеиназ с помощью аннотаций генной онтологии (Gene Ontology) и литературных данных. Информацию о локализации и функции каждого белка получали в базе данных UniProt и далее анализировали с помощью терминов генной онтологии (клеточная локализация, биологические процессы и молекулярные функции). Дополнительно проводили анализ функций ИП с помощью информации из литературных источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови трески. В 2D-SDS-PAGE фракция из ОАБ располагалась в правом поле относительно навигатора Tf и была пред-

ставлена множественными белками, из которых 20 ОАБ были идентифицированы (рис. 1). Пять из двадцати ОАБ относятся к ИП (табл. 1).

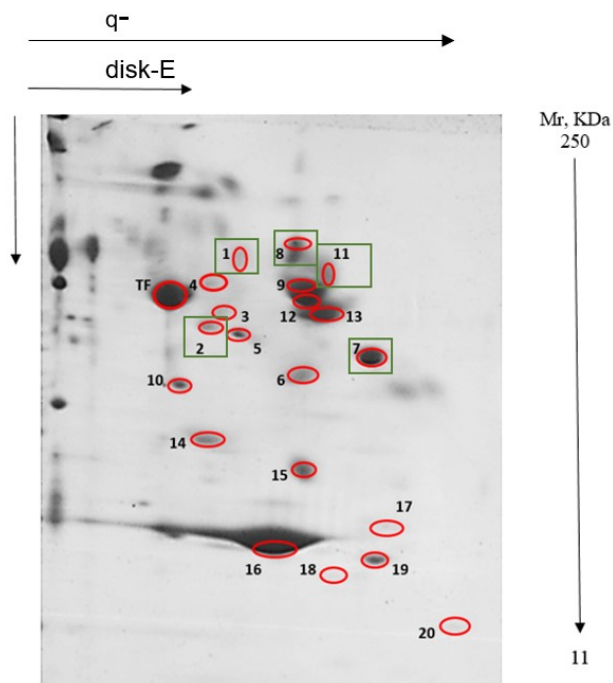


Рис. 1. 2D-SDS-PAGE сыворотки крови трески атлантической *Gadus morhua*: I направление (горизонтальная стрелка) — диск-электрофорез (disk-E), II направление (вертикальная стрелка слева) — SDS-электрофорез. Верхняя горизонтальная стрелка показывает направление усиления отрицательного заряда белка (q^-). Tf — трансферрин — “навигатор” для поиска белков с высокой осмотической активностью; ОАБ (1–20) — осмотически активные белки (выделены красными овалами); Mr, kDa — молекулярная масса белков в килодальтонах. Ингибиторы протеиназ выделены зелеными квадратами.

Fig. 1. 2D-SDS-PAGE of blood serum of the Atlantic cod *Gadus morhua*: I direction (horizontal arrow) — disk electrophoresis (disk-E), II direction (vertical arrow on the left) — SDS-electrophoresis. The upper horizontal arrow shows the direction of increase in the negative charge of the protein (q^-). Tf — transferrin — “navigator” for searching for proteins with high osmotic activity; OAB (1–20) — osmotically active proteins (highlighted by red ovals); Mr, kDa — molecular weight of proteins in kilodaltons. Proteinase inhibitors are highlighted by green squares.

Функции ингибиторов протеиназ в терминах генной онтологии. Анализ локализации в терминах генной онтологии показал нахождение ИП (а) в разных компартментах внутриклеточного пространства, что вероятно, отражает этапы продвижения белков от места

синтеза до выхода из клетки, и (б) во внеклеточном пространстве (кровь, внеклеточный матрикс и другие). Молекулярные функции и участие в биологических процессах ИП представлены в таблице 2.

Функции ингибиторов протеиназ с использованием литературных источников.
Краткость сведений по функциям ИП трески

из базы данных UniProt мы восполнили информацией по ИП человека из ряда литературных источников (табл. 3).

Таблица 1. Идентификация ингибиторов протеиназ из сыворотки крови трески атлантической

Table 1. Identification of proteinase inhibitors from Atlantic cod blood serum

№*	Кандидатный белок Candidate Protein	Результаты поиска Mascot Mascot Search Results	Молекулярные массы, Да $M_{r_{calc}} / M_{r_{obs}}, Da^{**}$	Показатель соответствия <i>Score</i>
1	alpha-2-antiplasmin [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030236562.1	54874/72000	117
2	alpha-2-HS-glycoprotein-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030228808.1	32309/54500	103
7	alpha-1-antitrypsin homolog [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030201052.1	47082/44000	173
8	fetuin-B-like [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030228824.1	53059/72000	96
11	kininogen-1-like isoform X2 [<i>Gadus morhua</i>]	XP_030227991.1	38746/68000	49

Примечание. *Обозначение и нумерация белков даны в соответствии с рис. 1.

** $M_{r_{calc}}$ — молекулярная масса кандидатов, рассчитанная в программе Mascot; $M_{r_{obs}}$ — молекулярная масса, рассчитанная в программе ONE-Dscan Ver 1.31 (Scananalytic Inc.) для белков из PAGE.

Note. *Protein designations and numbering are given in accordance with Fig. 1.

** $M_{r_{calc}}$ is the molecular mass of candidates calculated in the Mascot program; $M_{r_{obs}}$ is the molecular mass calculated in the ONE-Dscan Ver 1.31 program (Scananalytic Inc.) for proteins from PAGE.

Таблица 2. Характеристика ингибиторов протеиназ с помощью аннотаций Gene Ontology*

Table 2. Characterization of proteinase inhibitors using Gene Ontology annotations*

Кандидатный белок Candidate Protein	Группа Group	Молекулярные функции Molecular functions	Биологические процессы Biological processes
alpha-2-antiplasmin [<i>Gadus morhua</i>]	Ингибитор сериновых протеиназ (серпин)	Активность ингибитора эндопептидазы серинового типа	Реакция острой фазы; отрицательная регуляция активности пептидазы
alpha-1-antitrypsin homolog [<i>Gadus morhua</i>]	Ингибитор сериновых протеиназ (серпин)	Активность ингибитора эндопептидазы серинового типа	Реакция острой фазы; отрицательная регуляция активности пептидазы
alpha-2-HS-glycoprotein-like [<i>Gadus morhua</i>]	Ингибитор цистеиновых протеиназ (цистатин)	Активность ингибитора эндопептидазы цистеинового типа; активность ингибитора киназы	Реакция острой фазы; отрицательная регуляция активности эндопептидазы
fetuin-B-like [<i>Gadus morhua</i>]	Ингибитор цистеиновых протеиназ (цистатин)	Активность ингибитора эндопептидазы цистеинового типа; активность ингибитора металло-эндопептидазы	Реакция острой фазы; отрицательная регуляция активности эндопептидазы
kininogen-1-like isoform X2 [<i>Gadus morhua</i>]	Ингибитор цистеиновых протеиназ (цистатин)	Активность ингибитора эндопептидазы цистеинового типа	Отрицательная регуляция активности эндопептидазы; отрицательная регуляция свертывания крови

Примечание. *Информация из базы данных UniProt.

Note. *Information from the UniProt database.

Таблица 3. Характеристика ингибиторов протеиназ по литературным источникам

Table 3. Characteristics of proteinase inhibitors according to literary sources

Кандидатный белок Candidate protein	Основные функции* / Main functions*			Концентрация в плазме* Plasma concentration*
	Свертывание крови Blood clotting	Реакции острой фазы Acute phase reactions	Другие Other	
alpha-2-antiplasmin	Ингибирование плазмина, предотвращающее чрезмерное разрушение фибрина и	Регуляция воспалительного ответа [Kawashita et al., 2020]	—	2–8 мкмоль/л [Lee et al., 2004]

Кандидатный белок Candidate protein	Основные функции* / Main functions*			Концентрация в плазме* Plasma concentration*
	Свертывание крови Blood clotting	Реакции острой фазы Acute phase reactions	Другие Other	
alpha-1-antitrypsin homolog	образование гематом; поддержание баланса между свертыванием и растворением сгустков [Kawashita et al., 2020] Локальная регуляция протеаз, участвующих в коагуляции и фибринолизе [Talens et al., 2013]. Поддержание баланса между протеолитическими ферментами и их ингибиторами [Бродская, 2008 (Brodskaia, 2008)]	Ингибирование различных протеаз, включая нейтрофильную эластазу, защищающее легкие и другие ткани от повреждений [Бродская, 2008 (Brodskaia, 2008)]	—	1.5–3.5 г/л (0.15–0.35 г%) [Hughes et al., 1996]
alpha-2-HS-glycoprotein-like	Ингибирование факторов свертывания, модуляция фибринолиза, антикоагулянтные свойства [Srinivas et al., 1993]	Участие в иммунном ответе, противовоспалительное действие, защита клеток, регуляция воспалительных процессов [Gene ID: 197; NCBI]	Основной переносчик свободных жирных кислот в кровотоке, транспорт липидов, регуляция роста и развития, регуляция минерального обмена (особенно кальция и фосфата) [Srinivas et al., 1993]	0.6–1.2 г/л (0.06–0.12 г%) [Mathews et al., 2002]
fetuin-B-like	Ингибирование факторов свертывания [Nynca et al., 2010]	Участие в иммунном ответе, регуляция воспалительных процессов [Nynca et al., 2010]	Транспорт липидов, регуляция роста и развития, регуляция репродуктивной функции [Nynca et al., 2010]	0.6–1.2 г/л (0.06–0.12 г%) [Michle et al., 2018]
kininogen-1-like isoform X2	Предшественник кининов — биологически активных пептидов. Участие в каскаде реакций, приводящих к образованию фибрина [Wang et al., 2010]	Участие в воспалительных и аллергических реакциях (кинины) [Wang et al., 2010]	Регуляция сосудистого тонуса [Wang et al., 2010]	400–800 мкг/мл (40–80 мг%) [Lieb et al., 2015]

Примечание. *Информация по высшим позвоночным.

Note. *Information on higher vertebrates.

ОБСУЖДЕНИЕ

Все идентифицированные у трески ИП относятся к семействам ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ — серпинам (Spi) и цистатинам (CY). К Spi относятся: alpha-2-antiplasmin, alpha-1-antitrypsin homolog. К CY относятся: kininogen-1-like и два фетуиноподобных белка — alpha-2-HS-glycoprotein-like (fetuin-A) и fetuin-B-like.

К наиболее важным функциям ИП относят их участие в реакции острой фазы (РОФ) и

свертывании крови. РОФ представляет собой комплекс физиологических изменений, которые происходят в организме в ответ на травму, инфекцию или другое повреждение [Travis et al., 1988]. Серпины реагируют на вирусные инфекции: они являются необратимыми ингибиторами протеиназ [Stein et al., 1995; Jančauskiene, 2001]. Фетуины реагируют на бактериальные инфекции: они играют важную роль в ингибировании цистеиновых протеаз

во всех типах тканей [Liu et al., 2016; Li et al., 2017]. Концентрация участвующих в РОФ белков, включая ИП, увеличивается в плазме на ~50% относительно нормы [Engler, 1988]. Роль ИП в РОФ обусловлена их взаимодействием с протеазами, активность которых возрастает при воспалении: ИП могут связываться с протеазами и блокировать их активность, предотвращая разрушение тканей, что важно для поддержания целостности тканей и предотвращения распространения инфекции [Sandri et al., 2025]. В то же время, снижение уровня ИП может привести к усилению активности протеаз и разрушения тканей. В таблице 2 не отмечено участие белка kininogen-1-like в РОФ. Это связано с тем, что этот ИП, не принимая прямого участия в воспалительном ответе, является источником образования кининов, которые относятся к белкам острой фазы РОФ и участвуют

в воспалительных и аллергических реакциях [Wang et al., 2010]. Другая важная функция ИП — регуляция активности протеолитических ферментов системы свертывания крови: ИП являются важными компонентами системы гемостаза, участвующими в поддержании баланса между свертыванием крови и фибринолизом, что предотвращает образование тромбов и кровотечения [Travis et al., 1983]. На рисунке 2 представлена общая схема свертывания крови и отмечены ИП, которые принимают участие в этом процессе. Помимо участия в РОФ и свертывании крови, ИП задействованы в транспорте липидов и регуляции ряда функций и процессов (роста, развития, минерального обмена, репродуктивной функции, сосудистого тонуса).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди перечисленных функций ИП в аннотациях геномной онтологии и литературных источниках отсутствует осмотическая, вероятно, ввиду того что все белки плазмы позвоночных проявляют ее в той или иной степени. Однако у безальбуминовых костистых рыб, включая атлантическую треску, ИП входят в состав фракции белков с повышенной осмотической активностью, обусловленной их высоким отрицательным зарядом, сопоставимым с сывороточным альбумином человека [Андреева, в печ. (Andreeva, in press)]. “Безальбуминовая” модель капиллярного обмена у костистых рыб [Andreeva, 2020] объясняет участие ИП и других

высоко электроотрицательных белков плазмы в замещении осмотической функции “потерянного” в ходе эволюции альбумина. Высокое суммарное относительное содержание (ОС) таких белков в плазме рыб сопоставимо с ОС сывороточного альбумина в крови млекопитающих (~60% общего белка плазмы) [Anguizola et al., 2013]. Это обстоятельство, в соответствии с уравнением Вант-Гоффа для коллоидных растворов (и в применении к плазме крови), предполагает значительный вклад белков с высокой осмотической активностью (включая ИП) у безальбуминовых рыб в онкотическое давление плазмы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания 124032500015-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева А.М. Критерии поиска белков с высокой осмотической активностью в крови безальбуминовых костистых рыб // Биология внутренних вод, 2025. (в печ.)
- Базарова З.М., Торопыгин И.Ю., Васильев А.С. и др. Поиск и идентификация осмотически активных белков в сыворотке крови атлантической трески *Gadus morhua* // Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. 2022. Вып. 99(102). С. 88–92. DOI: 10.47021/0320-3557-2022-88-92.
- Базарова З.М., Васильев А.С., Павлова П.А., Торопыгин И.Ю., Андреева А.М. Анализ терминов геномной онтологии для белков с высокой осмотической активностью из сыворотки крови атлантической трески *Gadus morhua* // Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. 2024. Вып. 106(109). С. 75–85. DOI: 10.47021/0320-3557-2024-75-85.
- Бродская О.Н. Наследственная недостаточность альфа-1-антитрипсина // Практическая пульмонология. 2008, №4. С. 58–59. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nasledstvennaya-nedostatocnost-alfa-1-antitripsina>
- Ярец Ю.И. Специфические белки: практическое пособие для врачей: в 2 частях. Часть II. Клинико-диагностическое значение определения специфических белков. Гомель: ГУ “РНПЦ РМиЭЧ”, 2015. 47 с.
- Andreeva A.M. Structural Organization of Plasma Proteins as a Factor of Capillary Filtration in Pisces // Inland Water Biology. 2020. Vol. 13(4). P. 664–673. DOI: 10.1134/S1995082920060036.
- Andreeva A.M. Organization and function of osmotically active fraction of fish (Pisces) plasma proteome // Inland Water Biology. 2021. vol. 14(4). P. 449–460. DOI: 10.1134/S1995082921040039.
- Andreeva A.M. Evolutionary transformations of albumin using the example of model species of jawless Agnatha and bony jawed fish (review) // Inland Water Biology. 2022. Vol. 15(5). P. 641–658. DOI: 10.1134/S1995082922050029.

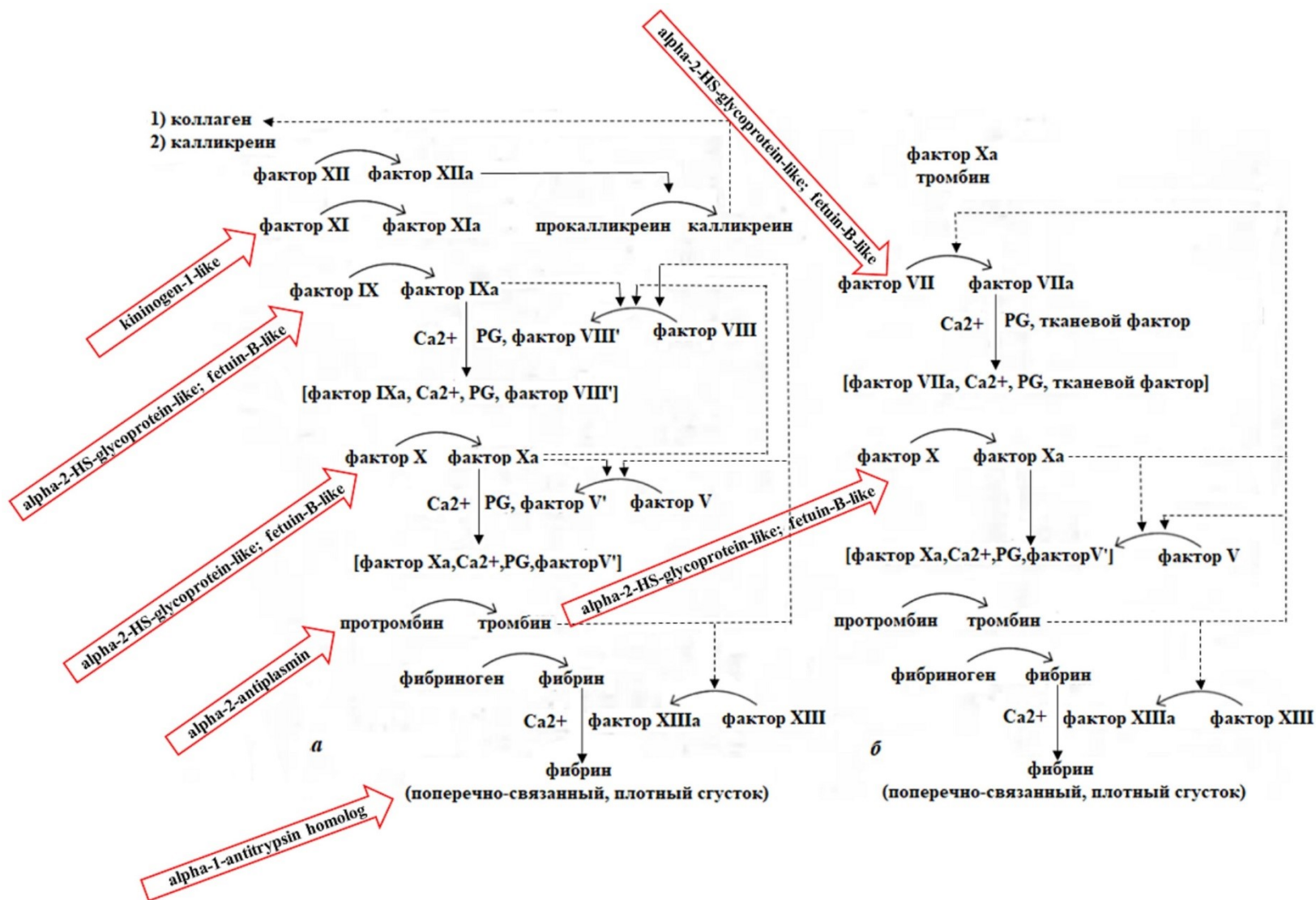


Рис. 2. Схема свертывания крови (а — внутренний путь, б — внешний путь) [по White A. et al., 1981]. Красным отмечены ИП, участвующие в этом процессе.

Fig. 2. Blood clotting diagram (a — internal path, b — external path) [by White A. et al., 1981]. The IPs involved in this process are marked in red.

- Andreeva A.M., Bazarova Z.M., Toropygin I.Yu. et al. Serum osmotically active proteins in the Atlantic cod *Gadus morhua* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023. Vol. 59. P. 325–336. DOI: 10.1134/S0022093023020023.
- Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S. et al. Review: Glycation of human serum albumin // *Clin. Chim. Acta.* 2013. Vol. 425. P. 64–76.
- Braasch I., Gehrke A.R., Smith J.J. et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons // *Nat. Genet.* 2016. Vol. 48. № 4. P. 427–437.
- Engler R. Protéines de la réaction inflammatoire. Fonctions régulatrices [Proteins of the inflammatory reaction. Regulatory functions] // *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 1988. Vol. 46, № 5. P. 336–342. French. PMID: 2458687.
- Hughes D., Goldschmidt M.H., Washabau R.J., Kueppers F. Serum alpha 1-antitrypsin concentration in dogs with pancreatitis // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996. Vol. 209(9). P. 1582–1584.
- Jančauskiene S., Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) determine their numerous pathophysiological functions // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, 2001. Vol. 1535, № 3. P. 221–235. DOI: 10.1016/S0925-4439(01)00025-4.
- Kawashita E., Ishihara K., Miyaji H. et al. α 2-Antiplasmin as a potential regulator of the spatial memory process and age-related cognitive decline // *Mol. Brain.* 2020. Vol. 13. P. 140. DOI: 10.1186/s13041-020-00677-3.
- Lee K.N., Jackson K.W., Christiansen V.J., Chung K.H., McKee P.A. Alpha2-antiplasmin: potential therapeutic roles in fibrin survival and removal // *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* 2004. Vol. 2(4). P. 303–310. DOI: 10.2174/1568016043356228.
- Li C., Gao C., Fu Q. et al., Identification and expression analysis of fetuin b (FETUB) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) mucosal barriers following bacterial challenge // *Fish Shellfish Immunol.* 2017. Vol. 68. P. 386–394. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.07.032.
- Lieb W., Chen M.H., Teumer A. et al. Genome-wide meta-analyses of plasma renin activity and concentration reveal association with the kininogen 1 and prekallikrein genes // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2015. Vol. 8(1). P. 131–140. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000613.
- Liu F., Su B., Gao C., et al., Identification and expression analysis of TLR2 in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. Vol. 55. P. 654–661. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.06.047.
- Mathews S.T., Deutsch D.D., Iyer G. et al. Plasma alpha2-HS glycoprotein concentrations in patients with acute myocardial infarction quantified by a modified ELISA // *Clin. Chim. Acta.* 2002. Vol. 319(1). P. 27–34. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00013-x.
- Miehle K., Ebert T., Kralisch S. et al. Serum concentrations of fetuin B in lipodystrophic patients // *Cytokine.* 2018. Vol. 106. P. 165–168. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.10.028.
- Noel E.S., Reis M., Arai Z., Ober E.A. Analysis of the Albumin/ α -Fetoprotein/Afamin/Group specific component gene family in the context of zebrafish liver differentiation // *Gene Expression Patterns.* 2010. Vol. 10(6). P. 237–243. DOI: 10.1016/j.gep.2010.05.002.
- Nynca J., Slowinska M., Dietrich M. et al. Isolation and identification of fetuin-B-like protein from rainbow trout seminal plasma and its localization in the reproductive system // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2010. Vol. 158(1). P. 106–116. DOI: 10.1016/j.cbpb.2010.10.002.
- Nynca J., Arnold G., Fröhlich T., Ciereszko A. Proteomic identification of rainbow trout blood plasma proteins and their relationship to seminal plasma proteins // *Proteomics.* 2017. Vol. 17(11). P. 1–15. DOI: 10.1002/pmic.201600460.
- Ohno S. Evolution by Gene Duplication. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1970. 160 p. DOI: 10.1007/978-3-642-86659-3.
- Pasquier J., Cabau C., Nguyen T. et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database // *BMC Genomics.* 2016. Vol. 17(368). P. 1–10. DOI: 10.1186/s12864-016-2709-z.
- Sandri A., Boschi F. Exploring Proteases as Alternative Molecular Targets to Tackle Inflammation in Cystic Fibrosis Respiratory Infections // *Int. J. Mol. Sci.* 2025. Vol. 26(5). e1871. DOI: 10.3390/ijms26051871.
- Srinivas P.R., Wagner A.S., Reddy L.V. et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level // *Mol. Endocrinol.* 1993. Vol. 7(11). P. 1445–1455. DOI: 10.1210/mend.7.11.7906861.
- Stein P.E., Carrell R.W. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? // *Nat. Struct. Biol.* 1995. Vol. 2(2). P. 96–113. DOI: 10.1038/nsb0295-96.
- Talens S., Malfliet J.J., van Hal P.T., Leebeek F.W., Rijken D.C. Identification and characterization of α 1 -antitrypsin in fibrin clots // *J. Thromb. Haemost.* 2013. Vol. 11(7). P. 1319–1328. DOI: 10.1111/jth.12288.
- Travis J., Salvesen G. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors // *Behring Inst. Mitt.* 1983. Vol. 73. P. 56–65.
- Travis J., Shieh B.H., Potempa J. The functional role of acute phase plasma proteinase inhibitors // *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 1988. Vol. 13(6). P. 313–320.
- Wang F., Yu J., Qiu Q.H., Bai L., Cao H. Kininogen-1 and insulin-like growth factor binding protein-6 as serum biomarkers for proliferative vitreoretinopathy // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2010. Vol. 46(7). P. 609–614.
- White A., Hendler F., Smith E., Hill R., Lehman I. Fundamentals of Biochemistry. Moscow, Mir, 1981. Vol. 3, pp. 1180.

REFERENCES

- Andreeva A.M. Criteria for searching for proteins with high osmotic activity in the blood of albumin-free bony fish. *Inland Water Biology.* (in press).

- Andreeva A.M. Evolutionary transformations of albumin using the example of model species of jawless Agnatha and bony jawed fish (review). *Inland Water Biology*, 2022, vol. 15(5), pp. 641–658. doi: 10.1134/S1995082922050029.
- Andreeva A.M. Organization and function of osmotically active fraction of fish (Pisces) plasma proteome. *Inland Water Biology*, 2021, vol. 14(4), pp. 449–460. doi: 10.1134/S1995082921040039.
- Andreeva A.M. Structural organization of plasma proteins as a factor of capillary filtration in pisces // *Inland Water Biology*. 2020. Vol. 13(4). P. 664–673. doi: 10.1134/S1995082920060036.
- Andreeva A.M., Bazarova Z.M., Toropygin I.Yu. et al. Serum osmotically active proteins in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 2023, vol. 59, pp. 325–336. doi: 10.1134/S0022093023020023.
- Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S. et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin. Chim. Acta.*, 2013, vol. 425, pp. 64–76.
- Bazarova Z.M., Toropygin I.Yu., Vasil'ev A.S. i dr. Poisk i identifikatsiya osmoticheski aktivnykh belkov v syvorotke krovi atlanticheskoy treski *Gadus morhua* [Search and identification of osmotically active proteins in the blood serum of the atlantic cod *Gadus morhua*]. *Transactions of Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS*, 2022, iss. 99(102), pp. 88–92. doi: 10.47021/0320-3557-2022-88-92. (In Russia)
- Bazarova Z.M., Vasil'ev A.S., Pavlova P.A., Toropygin I.Yu., Andreeva A.M. Analiz terminov gennoj ontolo-gii dlya belkov s vysokoj osmoticheskoy aktivnost'yu iz syvorotki krovi atlanticheskoy treski *Gadus morhua* [Analysis of gene ontology terms for proteins with high osmotic activity from the blood serum of Atlantic cod *Gadus morhua*]. *Transactions of Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS*, 2024, iss. 106(109), pp. 75–85. doi: 10.47021/0320-3557-2024-75-85. (In Russia)
- Braasch I., Gehrke A.R., Smith J.J. et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nat. Genet.*, 2016, vol. 48, no. 4, pp. 427–437.
- Brodskaya O.N. Nasledstvennaya nedostatochnost' al'fa-1-antitripsina [Hereditary deficiency of alpha-1-antitrypsin]. *Prakticheskaya pul'monologiya*, 2008, no. 4, pp. 58–59. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nasledstvennaya-nedostatochnost-alfa-1-antitripsina> (In Russia)
- Engler R. Protéines de la réaction inflammatoire. Fonctions régulatrices [Proteins of the inflammatory reaction. Regulatory functions]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 1988, vol. 46, no 5, pp. 336–342. (In French)
- Hughes D., Goldschmidt M.H., Washabau R.J., Kueppers F. Serum alpha 1-antitrypsin concentration in dogs with pan-niculitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, vol. 209(9), pp. 1582–1584.
- Jančauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) determine their numerous pathophysiological functions. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.*, 2001, vol. 1535, no. 3, pp. 221–235. doi: 10.1016/s0925-4439(01)00025-4.
- Kawashita E., Ishihara K., Miyaji H. et al. α 2-Antiplasmin as a potential regulator of the spatial memory process and age-related cognitive decline. *Mol. Brain*, 2020, vol. 13, p. 140. doi: 10.1186/s13041-020-00677-3.
- Lee K.N., Jackson K.W., Christiansen V.J., Chung K.H., McKee P.A. Alpha2-antiplasmin: potential therapeutic roles in fibrin survival and removal. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents*, 2004, vol. 2(4), pp. 303–310. doi: 10.2174/1568016043356228.
- Li C., Gao C., Fu Q. et al., Identification and expression analysis of fetuin b (FETUB) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) mucosal barriers following bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.*, 2017, vol. 68, pp. 386–394. doi: 10.1016/j.fsi.2017.07.032.
- Lieb W., Chen M.H., Teumer A. et al. Genome-wide meta-analyses of plasma renin activity and concentration reveal association with the kininogen 1 and prekallikrein genes. *Circ. Cardiovasc Genet.*, 2015, vol. 8(1), pp. 131–140. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000613.
- Liu F., Su B., Gao C. et al., Identification and expression analysis of TLR2 in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.*, 2016, vol. 55, pp. 654–661. doi: 10.1016/j.fsi.2016.06.047.
- Mathews S.T., Deutsch D.D., Iyer G. et al. Plasma alpha2-HS glycoprotein concentrations in patients with acute myocardial infarction quantified by a modified ELISA. *Clin. Chim. Acta*, 2002, vol. 319(1), pp. 27–34. doi: 10.1016/s0009-8981(02)00013-x.
- Miehle K., Ebert T., Kralisch S. et al. Serum concentrations of fetuin B in lipodystrophic patients. *Cytokine*, 2018, vol. 106, pp. 165–168. doi: 10.1016/j.cyto.2017.10.028.
- Noel E.S., Reis M., Arai Z., Ober E.A. Analysis of the Albumin/ α -Fetoprotein/Afamin/Group specific component gene family in the context of zebrafish liver differentiation. *Gene Expression Patterns*, 2010, vol. 10(6), pp. 237–243. doi: 10.1016/j.gep.2010.05.002.
- Nynca J., Arnold G., Fröhlich T., Ciereszko A. Proteomic identification of rainbow trout blood plasma proteins and their relationship to seminal plasma proteins. *Proteomics*, 2017, vol. 17(11), pp. 1–15. doi: 10.1002/pmic.201600460.
- Nynca J., Slowinska M., Dietrich M. et al. Isolation and identification of fetuin-B-like protein from rainbow trout seminal plasma and its localization in the reproductive system. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 2010, vol. 158(1), pp. 106–116. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.10.002.
- Ohno S. Evolution by Gene Duplication. Berlin; New York, Springer-Verlag, 1970. 160 p. doi: 10.1007/978-3-642-86659-3.
- Pasquier J., Cabau C., Nguyen T. et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the PhyloFish database. *BMC Genomics*, 2016, vol. 17(368), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12864-016-2709-z.

- Sandri A., Boschi F. Exploring Proteases as Alternative Molecular Targets to Tackle Inflammation in Cystic Fibrosis Respiratory Infections. *Int. J. Mol. Sci.*, 2025, vol. 26(5), e1871. doi: 10.3390/ijms26051871.
- Srinivas P.R., Wagner A.S., Reddy L.V. et al. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol. Endocrinol.*, 1993, vol. 7(11), pp. 1445–1455. doi: 10.1210/mend.7.11.7906861.
- Stein P.E., Carrell R.W. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat. Struct. Biol.*, 1995, vol. 2(2), pp. 96–113. doi: 10.1038/nsb0295-96.
- Talens S., Malfliet J.J., van Hal P.T., Leebeek F.W., Rijken D.C. Identification and characterization of $\alpha 1$ -antitrypsin in fibrin clots. *J. Thromb. Haemost.*, 2013, vol. 11(7), pp. 1319–1328. doi: 10.1111/jth.12288.
- Travis J., Salvesen G. Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst. Mitt.*, 1983, vol. 73, pp. 56–65.
- Travis J., Shieh B.H., Potempa J. The functional role of acute phase plasma proteinase inhibitors. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 1988, vol. 13(6), pp. 313–320.
- Wang F., Yu J., Qiu Q.H., Bai L., Cao H. Kininogen-1 and insulin-like growth factor binding protein-6 as serum biomarkers for proliferative vitreoretinopathy. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2010, vol. 46(7), pp. 609–614.
- White A., Hendler F., Smith E., Hill R., Lehman I. Fundamentals of Biochemistry. Moscow, Mir, 1981. Vol. 3, pp. 1180.
- Yarets Yu.I. Spetsificheskie belki: prakticheskoe posobie dlya vrachej: v 2 chastyakh. Chast' II. Kliniko-dagnosticheskoe znachenie opredeleniya spetsificheskikh belkov [Specific proteins: a practical guide for doctors: in 2 parts. Part II. Clinical and diagnostic significance of determining specific proteins]. Gomel', GU "RNPTS RMIEHCH", 2015. 47 p. (In Russia)

PROTEINASE INHIBITORS AS OSMOTIC ACTIVE FACTORS IN FISH BLOOD PLASMA BY THE EXAMPLE OF ATLANTIC COD *GADUS MORHUA*

Z. M. Bazarova¹, M. A. Konstantinov², A. S. Vasiliev¹, I. Yu. Toropygin^{1,2}, A. M. Andreeva^{1*}

¹Papanin Institute of Biology of Inland Waters RAS, 152742, Borok, Russia; e-mail: *aam@ibiw.ru

²V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 119121, Moscow, Russia

Revised 25.04.2025

This paper examines the functions of proteinase inhibitors in the blood plasma of Atlantic cod *Gadus Morhua* using Gene Ontology terms and literature sources, including the authors' work. The main properties of proteinase inhibitors, their mechanisms of action, and their impact on various physiological processes are discussed.

Keywords: proteinase inhibitors, Atlantic cod, blood serum, osmotically active proteins, electrophoresis, MALDI, gene ontology