

На правах рукописи

Памирский Игорь Эдуардович

АНАЛИЗ СТЕПЕНИ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
ОДНОТИПНОСТИ ПОЛИВАЛЕНТНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ,
СОДЕРЖАЩЕГОСЯ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ЖИВОТНЫХ, И
СОЕВОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА

03.00.13 – физиология
03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Благовещенск – 2009

Работа выполнена на кафедре биологической химии ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
Бородин Евгений Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Лукьянова Ольга Николаевна

доктор биологических наук, профессор,
Новгородцева Татьяна Павловна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Читинская государственная
медицинская академия» Министерства
здравоохранения и социального развития
Российской Федерации

Защита состоится «12» ноября 2009 г. в 10-00 на заседании
Объединенного диссертационного совета ДМ 005.008.03 при Институте
биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН по адресу: 690041,
г.Владивосток, ул.Пальчевского, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии
моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Автореферат разослан « 1 » октября 2009 г.

Ученый секретарь Объединенного
диссертационного совета, к.м.н.



А.Ю. Горькавая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ферментативный гидролиз белков (протеолиз) лежит в основе регуляции важных физиологических процессов (переваривание белковых компонентов пищи, образование кровеносных сосудов, иммунный ответ, секреция) на разных уровнях организации (Seiki, Yana, 2003; Chondrogianni, Gonos, 2008; Skórko-Glonek, Sobiecka-Szkatuła, 2008). Протекание протеолиза обеспечивается большим количеством протеолитических ферментов (протеаз), которые способны функционировать внутри и вне клеток. Типичными представителями ферментов класса протеаз являются трипсин, калликреин, тромбин, плазмин, урокиназа, пепсин, дуоденаза, катепсины. Протеолиз регулируется преимущественно белками-ингибиторами, составляющими мощный антипротеолитический потенциал организма. Белки-ингибиторы встречаются в организмах млекопитающих, червей, микробов и растений (Zavasnik-Bergant, 2008). Предотвращая преждевременную и чрезмерную активность, либо полностью блокируя работу протеолитических ферментов, ингибиторные белки участвуют в механизмах многих сопряженных с протеолизом процессов, таких как свертывание крови, распад фибринового сгустка, активация комплемента и других. Функциональная деятельность ингибиторов не ограничивается влиянием на протеазы, они также могут препятствовать действию цитокинов, токсинов и ряда других биологически активных веществ (Зорин и соавт., 1995).

Особую группу белков-ингибиторов животного происхождения составляют серпины. Серпины ингибируют сериновые протеазы – ключевые ферменты, отвечающие за функционирование и взаимосвязь физиологических систем организма (пищеварение, иммунитет, гемостаз и др.). К характерным представителям данной группы белков относят гирудин, α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин и другие. Особый интерес представляет поливалентный ингибитор протеаз (апротинин), выделенный из органов крупного рогатого скота, который активно практикуется как регулятор протеолиза в организме человека. Аналоги белков-ингибиторов животного происхождения обнаружены у таких растений как табак, горчица, картофель, пшеница, соя и другие (Дунаевский и соавт., 2005; Мосолов, Валуева, 2005). В частности, к ним относятся ингибиторы из соевых бобов, способные препятствовать действию сериновых протеаз, подобно серпинам. К сожалению, вопрос о структурной и функциональной однотипности протеазных ингибиторов, присутствующих в организмах животных и растений, имеет существенные

пробелы. Поэтому в качестве объектов сравнения были выбраны поливалентный ингибитор протеаз поджелудочной железы животных (апротинин) и соевый ингибитор трипсина. Кроме того, актуальность данного исследования обуславливается исключительно важной ролью регуляторов протеолиза в функционировании физиологических процессов.

Цель работы: проанализировать степень структурной гомологии и функциональную однотипность апротинина животного происхождения и соевого ингибитора трипсина (СИТ).

Задачи исследования:

1. Методами биоинформатики установить степень структурной гомологии, спектр биологической активности и определить потенциальные молекулы-мишени апротинина и СИТ из числа протеаз организма человека.
2. Определить трипсин-ингибиторную активность апротинина и СИТ в опытах *in vitro*.
3. Изучить влияние апротинина и СИТ на свертывание крови (протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время и тромбиновое время).
4. Определить влияние апротинина и СИТ на фибринолиз (время фибринолиза).
5. Сравнить влияние апротинина и СИТ на агрегацию тромбоцитов (скорость и степень агрегации).
6. Проанализировать влияние апротинина и СИТ на функциональное состояние системы комплемента (гемолитическая активность комплемента).
7. Изучить влияние приема изолята соевого белка, содержащего соевый ингибитор трипсина, на общую протеолитическую и трипсин-ингибиторную активности в сыворотке крови людей.

Научная новизна исследования. Впервые методами биоинформатики показана высокая структурная гомологичность белкового ингибитора протеаз животного происхождения апротинина и его растительного аналога – соевого ингибитора трипсина (СИТ). Сравнение электронных структурных формул позволило выявить, что оба соединения являются ингибиторами ренина, а также ангиотензин-превращающего и эндотелин-превращающего ферментов. Апротинин и СИТ не обладают токсичностью, мутагенностью, канцерогенностью и тератогенностью. Произведено построение электронных трехмерных

третичных структур изученных соединений, что необходимо для расчета молекул-мишеней.

Впервые приведены доказательства, что апротинин и СИТ имеют не только структурное, но и функциональное сходство. Они в одинаковой степени ингибируют трипсин в опытах *in vitro*. При исследовании влияния на гемостатические показатели в опытах *in vitro* апротинин и СИТ препятствуют свертыванию крови (СИТ замедляет время свертывания по внутреннему и внешнему пути, а апротинин только по внутреннему) и блокируют фибринолиз. Оба соединения оказывают антиагрегационное действие, не различаясь между собой по силе торможения обратимой, двухфазной, необратимой АДФ-иницируемой и двухфазной адреналин-иницируемой агрегации. Растворы апротинина и СИТ в концентрации 0,01-1,0% не влияют на скорость и интенсивность комплемент-зависимого гемолиза.

Впервые получены данные, свидетельствующие, что двухмесячный прием соевого белка, содержащий активный СИТ, снижает общую протеолитическую и увеличивает трипсин-ингибиторную активность сыворотки крови.

Положения, выносимые на защиту:

1. На уровне первичной структуры белка апротинин и СИТ являются низкомолекулярными соединениями. Наиболее высокий уровень сходства наблюдается между С-концевым участком полипептидной цепи СИТ и молекулой апротинина.
2. Апротинин и СИТ проявляют высокую степень функциональной однотипности в отношении трипсина и физиологических показателей гемостаза.

Теоретическая значимость. Получены новые знания о структурной гомологии и функциональной однотипности апротинина и соевого ингибитора трипсина. Эти данные расширяют недостаточно разработанные представления о физиологической роли апротинина и соевого ингибитора трипсина в регуляции функциональных процессов организма (свертывание крови, фибринолиз, работа системы комплемента, агрегация тромбоцитов).

Исследование дополняет современное знание о воздействии экзогенных ингибиторов протеаз растительного и животного происхождения на плазменные белки, обеспечивающие гемостатическую и защитную функции крови человека.

Результаты данного исследования позволяют глубже понять механизмы ряда физиологических процессов (гемостаза, неспецифических

гуморальных и клеточных защитных механизмов), сопряженных с протеолизом.

Практическая значимость. В работе продемонстрирована адекватность использования ряда методов биоинформатики в исследовании гомологии белковых ингибиторов протеаз. Показана возможность перспективного использования соевого ингибитора протеаз в качестве регулятора протеолиза в организме, в частности процессов гемостаза. По результатам исследования оформлена приоритетная заявка на выдачу патента на изобретение «Способ коррекции общего уровня трипсин-ингибиторной активности сыворотки крови с помощью соевого печени, обогащенного активным соевым ингибитором». Предложен метод исследования гемолитической активности комплемента *in vitro*.

Новые данные о структурно-функциональной гомологии белков-ингибиторов протеаз, содержащихся в животных и растительных объектах, представляют интерес для поиска аналогов этих соединений с заданными биологическими свойствами.

Материалы диссертации включены в курс лекций кафедры биологической химии ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Практические рекомендации:

1. Используемые нами электронные базы белков содержат актуальную и достоверную информацию и могут применяться в исследовании белковых ингибиторов как средство биоинформатики.
2. Употребляя изолят соевого белка, обладающий антипротеазной активностью, можно корректировать уровень общей протеолитической активности сыворотки крови.
3. Полученные данные можно использовать при поиске и разработке новых регуляторов протеолиза в организме человека.

Апробация диссертации. Результаты исследования доложены и обсуждены на VII и VIII региональных научно-практических конференциях «Молодежь 21 века» (Благовещенск, 2006, 2007), X Дальневосточной молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2006), IV Международном Российско-Китайском фармацевтическом форуме (Благовещенск, 2007) и XV Российско-Японском медицинском симпозиуме (Благовещенск, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе одна статья в журнале, включенном в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть

опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», утвержденный ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 117 страницах компьютерного набора. Она содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, описание собственных результатов, обсуждение и выводы. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 27 рисунками. Список литературы включает 209 первоисточников, из них 58 отечественных и 151 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования. Препараты аprotинина («Контрикал», Германия) и соевого ингибитора трипсина («Reanal», Венгрия). Всего выполнено 684 пробы.

Биоинформационные методы (*in silico*). Для сравнения гомологии аминокислотных последовательностей использовали интернет-сервер BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) и программу Bio Edit 5.0.9. Спектр возможных биологических активностей определяли при помощи программ ISIS Draw 2.4 и PASS Professional. Для построения и визуализации электронных пространственных структур белков использовали программы Chem Office 5.0 и Yasara 6.2.5. Для работы с программами использовали файлы формата FASTA, MOL и PDB. С программами и сервером работали согласно прилагаемым инструкциям. Также применяли базы данных белков (Protein Data Bank, Uni Prot и др.).

Определение протромбинового времени (метод Квика). Протромбиновое время определяли с помощью тест-наборов «Техпластин-тест» («Технология Стандарт», Россия) в соответствии с прилагающейся инструкцией. Опытные образцы плазмы с трипсином и ингибиторами предварительно инкубировали на водяной бане в течение 5 минут при 37⁰С. Всего выполнено 48 проб.

Определение тромбинового времени. Тромбиновое время определяли с помощью тест-наборов «Тромбин-тест» («Ренам», Россия). Определение проводили в соответствии с инструкцией к тест-набору. Плазму с трипсином или ингибиторами инкубировали 5 минут на водяной бане при 37⁰С. Всего выполнено 48 проб.

Определение активированного частичного тромбопластинового времени. Активированное частичное тромбопластиновое время свертывания крови определяли с помощью тест-наборов «Коагуло-тест» («Ренам», Россия). Образцы плазмы с трипсином и ингибиторами

инкубировали на водяной бане в течение 5 минут при 37⁰С. Всего выполнено 48 проб.

Определение времени фибринолиза. Время фибринолиза определяли с помощью тест-наборов «Фибринолиз-тест» («Технология Стандарт», Россия) по прилагаемым инструкциям. Образцы опытной плазмы с трипсином или ингибитором предварительно инкубировали на водяной бане в течение 5 минут при 37⁰С. Всего выполнено 48 проб.

Исследование агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов в плазме исследовали на анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 («Солар», Беларусь), совмещенного с ПЭВМ, по методу указанному в инструкции к прибору. Опытную плазму с трипсином или ингибиторами предварительно инкубировали в термостате в течение 5 минут при 37⁰С. Всего выполнено 116 проб.

Определение трипсин-ингибиторной активности. Определение трипсин-ингибиторной активности исследуемых ингибиторов проводили по методу В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной (1977). Трипсин-ингибиторную активность определяли в сыворотке крови добровольцев (60 проб), солянокислых растворах исследуемых ингибиторов (80 проб) и растворах изолята соевого белка (60 проб).

Определение протеолитической активности. Определение общего уровня протеолитической активности в сыворотке крови проводили по методу В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной (1977). Выполнено 60 проб.

Определение гемолитической активности комплемента. Для исследования гемолитической активности комплемента *in vitro* нами был разработан способ реконструкции анализатора агрегации тромбоцитов SOLAR AP 2110, а также методика проведения эксперимента. Принцип метода заключается в регистрации изменений светопропускания раствора в процессе гемолитического распада эритроцитов. Метод позволяет наблюдать и контролировать ход измерений в динамике, а также хранить данные в виде электронных файлов. Всего выполнено 116 проб.

Исследование влияния приема соевого белка на протеолитическую и трипсин-ингибиторную активность крови человека. Исследование проводилось с участием врачей М.А. Штарберга и И.Г. Белоглазовой. Легитимность испытания на людях подтверждена Этическим комитетом ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия» (выписка из протокола от 23 сентября 2007 г.). В экспериментальную группу вошли 28 взрослых (средний возраст 50 лет) практически здоровых людей. Среди них было 16 женщин и 12 мужчин. Эксперимент длился 2 месяца, на протяжении которых добровольцы

употребляли изолят соевого белка (ежедневно по 30 г на человека). Кровь для исследований брали до и после 2-х месяцев приема изолята. В сыворотке крови определяли общий уровень протеолитической и трипсин-ингибиторной активности.

Статистические методы. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ «StatPlus 2007 Professional 4.3.0.0» и «StatSoft Statistica 6.0». Различия между группами устанавливались по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Обзор электронных баз данных белков

В Интернете нами было найдено более 100 баз данных с информацией о различных веществах. Белкам посвящено около 50 баз (список приводится в диссертации), среди которых только 9 (табл. 1) содержат информацию об апротинине и СИТ, представленную в виде электронных файлов специального формата.

Таблица 1

Базы белков, содержащие информацию об апротинине и СИТ

Название и электронный адрес базы данных	Идентификационный код в базе данных	
	Апротинин	СИТ
UniProt-Swiss-Prot http://www.expasy.org/	BPT1_BOVIN (P00974)	ITRA_SOYBN (P01070)
Blocks http://www.ebi.ac.uk/	P00974	IPR002160
COG http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	P00974; NP_001001554;	-
GTOP http://spock.genes.nig.ac.jp/	btau0:ENSBTAG0000 0017328	?atha0:At1g178 60.1
iProClass http://pir.georgetown.edu/	P00974/BPT1_BOVIN; PIRSF001621	-
LIGAND – LIGAND http://www.pasteur.fr/	50059016; 3809839; bta:616039; 100156830	-
MMDB http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	P00974 (Precursor); 1QLQ	1AVU
PDB http://www.rcsb.org/	1OA6	1AVU; 1BA7
MEROPS http://merops.sanger.ac.uk/	I02.001	I03.001

Определение степени гомологии аминокислотных последовательностей аprotинина и СИТ *in silico*

В ходе исследования установлено, что полипептидные цепи данных ингибиторов гомологичны на 10% (рис. 1).

Сравнение отдельных аминокислотных областей данных белков показало более высокий уровень гомологии (рис. 2). Наиболее гомологичными (35%) оказались С-концевая область СИТ (участок цепи 132-181) и молекула аprotинина без 6 последних С-концевых аминокислот.

BioEdit Sequence Alignment Editor - [Graphic Print: C:\BioEdit\Temp\~out.tmp]

File Edit Font World Wide Web Accessory Application RNA Options Window Help

Font: Courier New Residues per row: 60 Size: 11 Characters in titles: 20 Threshold (%): 70

Normal Back Similar Back Identical Back Canvas Redraw

Font Font Font Titles AutoFit to Printer

Outline Outline Ruler Page 1

Start codon(s) allowed: ATG Title Start numbers at: 1

Margins (inches): Left: 0.5 Right: 0.5 Top: 0.5 Bottom: 0.5 Matrix: BLOSUM Page Height: 11 in. Page Width: 8.5 in.

Note: This is a print preview. It may copy to the clipboard slightly large. To expand view, press arrow (upper left)

```

Aprotinin 1 ----- 1
SBTI 1 DFVLDNEGMPLENGGTYIILSDITAFGGIRAAPTGNERCPLTVVQSRNELDKGIGTIISS 60

Aprotinin 1 ----- 1
SBTI 61 PYRIRFIAEGHPLSLKFD SFAVIMLCVGIPT EWSVVEDLPEGPAVKIGENKDAMDGMFRL 120

Aprotinin 1 ----- 49
SBTI 121 ERVSDDEFNRYKLVFCFCQAEDDKCGDIGLSIDHDDGTRR---LWVSKNREPLVVCFCKLD 177

Aprotinin 49 -DCMRTC GGA 58
SBTI 178 KEST----- 181
  
```

Рис. 1. Результаты подсчета гомологии аprotинина (Aprotinin) и СИТ (SBTI) в Bio Edit 5.0.9 (черным цветом выделены идентичные аминокислоты, серым – химически подобные).

```

Aprotinin 1 ~~RDFC L E P P Y T G P C K A R M I K Y F Y N I R S R S C E E F T Y G G C E A K K N N F E A M E D C M R T C G G A 58
SBTI 1 DFVLDNEGMPLENGGTYIILSDITAFGGIRAAPTGNERCPLTVVQSRNELDKGIGTIISS 60

Aprotinin 1 R P D F C L E P P Y T G P C K A R M I K Y F Y N I R S R S C E E F T Y G G C E A K K N N F E A M E D C M R T C G G A 58
SBTI 61 P Y R I R F I A E G H P L S L K F D S F A V I M L C V G I P T E W S V V E D L P E G P A V K I G E N K D A M D G M F R L 120

Aprotinin 1 R P D F C L E P P Y T G P C K A R M I K Y F Y N I R S R S C E E F T Y G G C E A K K N N F E A M E - D C M R T C G G A 58
SBTI 132 K L V F C F C Q A E D D K C G D I G L S I D H D D G T R R - - - L W V S K N R E P L V V C F C K L D K E S T - - - - - 181
  
```

Рис. 2. Результаты определения гомологичных областей полипептидных цепей аprotинина (Aprotinin) и СИТ (SBTI).

Согласно представлениям классической протеомики, эволюционно родственные белки, независимо от количества аминокислот, входящих в их состав, и различий третичной структуры, имеют консервативные области (домены), определяющие свойства белков. Например, в родственных глутамилэндопептидазах бактерий неизменны только пять аминокислотных остатков из 215 (Степанов, 1998). Поэтому полученные нами данные указывают на гомологию полипептидных цепей апротинина и СИТ.

Определение и сопоставление спектров биологической активности апротинина и СИТ *in silico*

Нами были построены электронные структурные формулы апротинина и СИТ формата MOL для программы PASS (рис. 3).

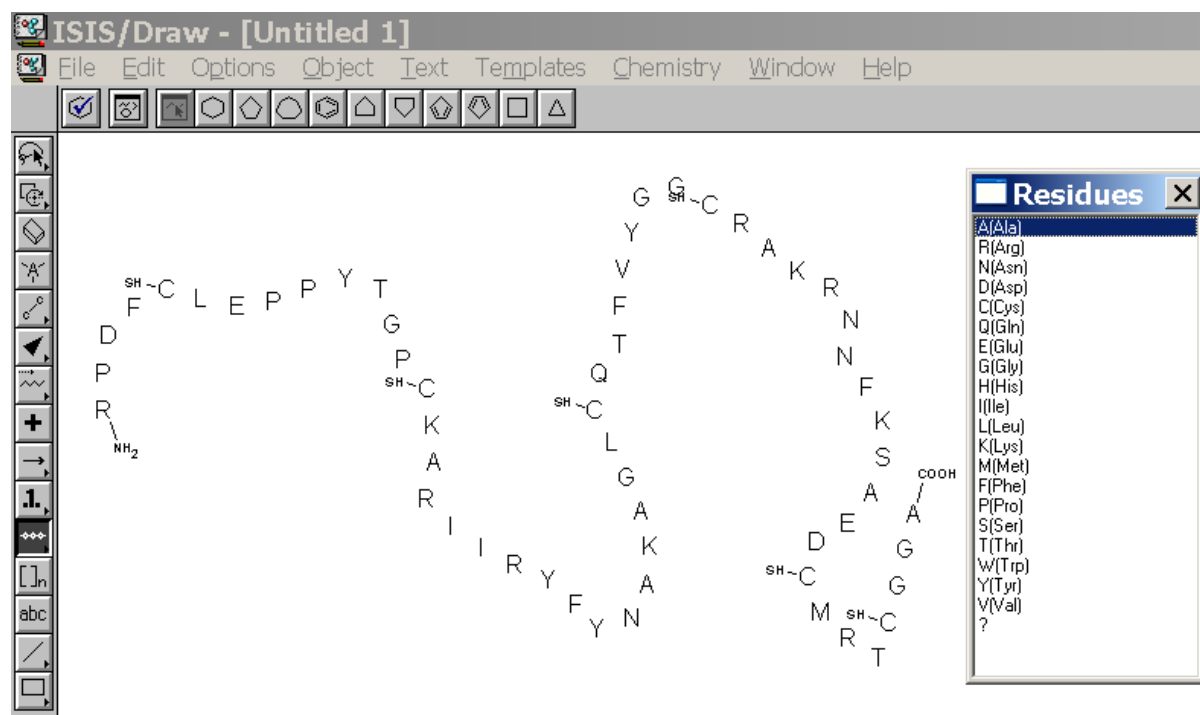


Рис. 3. Полипептидная цепь апротинина.

В окне «Residues» приведена таблица обозначений аминокислот.

Выявлено 4 вида активности для апротинина и 3 для СИТ (рис. 4). Программа показала, что данные белки являются ингибиторами ренина, ангиотензин- и эндотелин-превращающего ферментов.

Возможность проявления (drug-likeness) перечисленных эффектов практически одинакова у обоих ингибиторов. Также установлено, что исследуемые ингибиторы не обладают токсичностью, мутагенностью, канцерогенностью и тератогенностью.

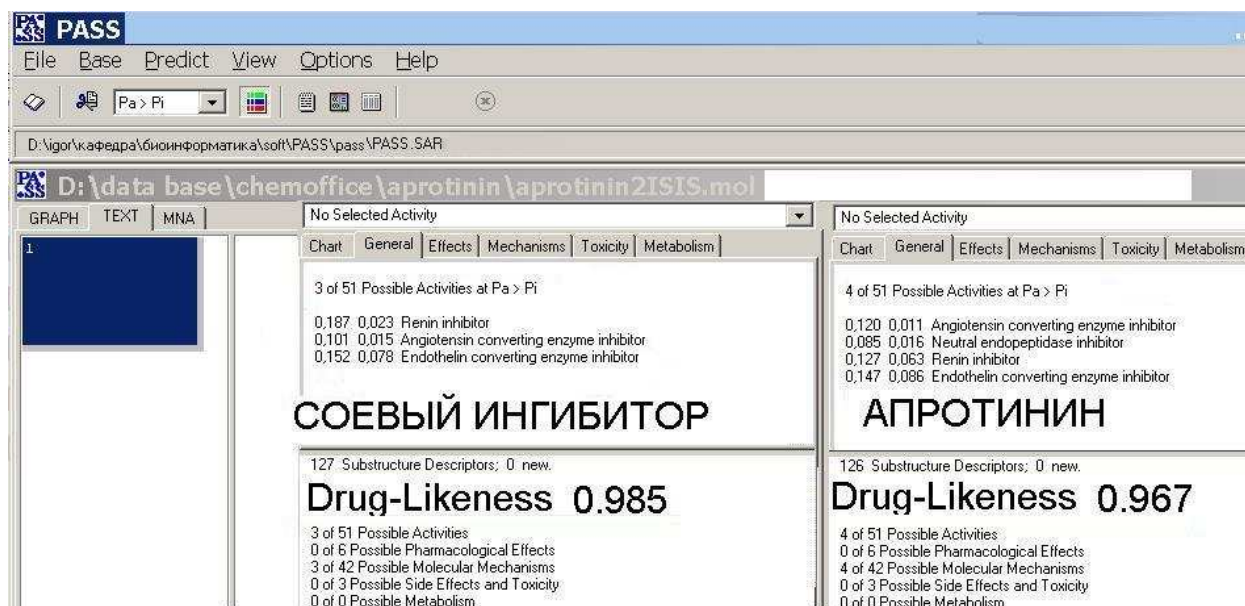


Рис. 4. Спектр биологической активности аprotинина и СИТ «Drug-Likeness» – вероятность проявления эффекта; P_a – вероятность наличия активности; P_i – вероятность отсутствия активности.

Построение электронных трехмерных третичных структур аprotинина и СИТ *in silico*

В исследовании механизма действия и биологических функций белковых соединений большую ценность представляет их трехмерная структура (Blundell et al., 2006; Pazos, Bang, 2006; Silveira et al., 2007). Поэтому с целью более тщательного изучения функциональности и выявления молекул-мишеней, нами были построены электронные пространственные структуры аprotинина и СИТ (рис. 5).

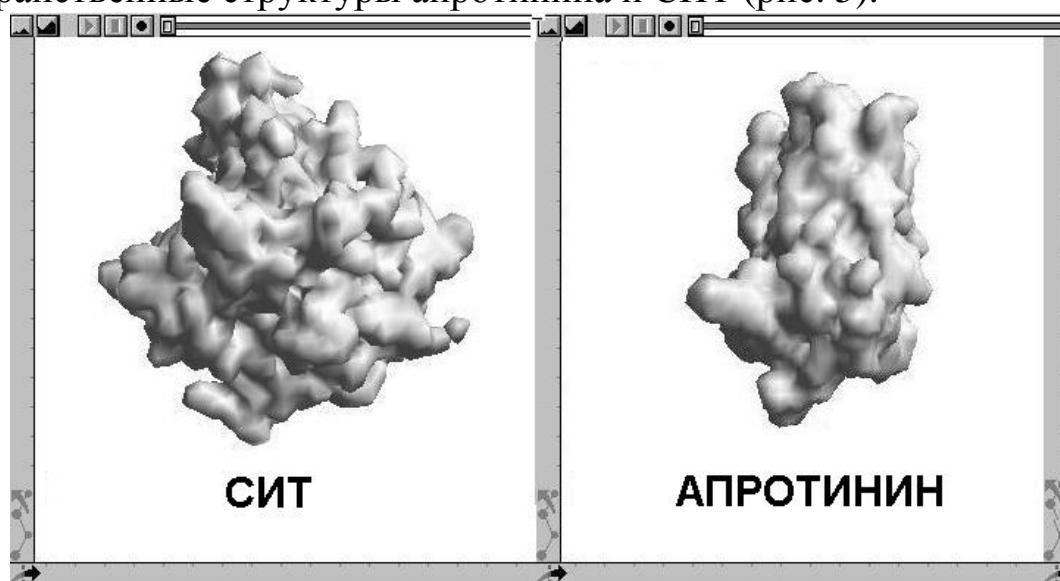


Рис. 5. Электронные трехмерные модели третичных структур аprotинина и СИТ (построено в программе Chem Office 5.0).

Произвести поиск молекул-мишеней методами биоинформатики не удалось из-за отсутствия необходимых программ в свободном доступе. В целом, полученные методами биоинформатики данные показали статистически достоверную степень структурной и функциональной однотипности апротинина и СИТ, что явилось предпосылкой дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*.

Трипсин-ингибиторная активность апротинина и СИТ *in vitro*

Результаты определения активности отображены на рисунках 6 и 7. Для сравнения мы определили активность синтетических ингибиторов. Установлено, что трипсин-ингибиторная активность снижается в следующей последовательности: апротинин ($141,1 \pm 13,3$ ИЕ/мг), СИТ ($61,4 \pm 0,9$ ИЕ/мг), D-лизин ($1,31 \pm 0,02$ ИЕ/мг), ϵ -аминокапроновая кислота ($1,36 \pm 0,04$ ИЕ/мг). Таким образом, активность апротинина при данном способе расчета более чем в 2 раза выше таковой СИТ ($p < 0,0002$).

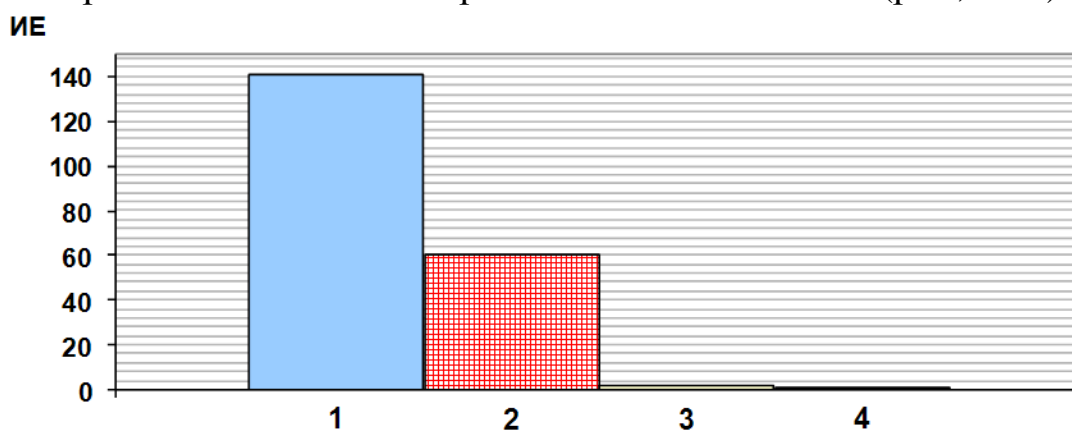


Рис. 6. Трипсин-ингибиторная активность апротинина (1), СИТ (2), ϵ -аминокапроновой кислоты (3) и D-лизина (4) в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 мг вещества.

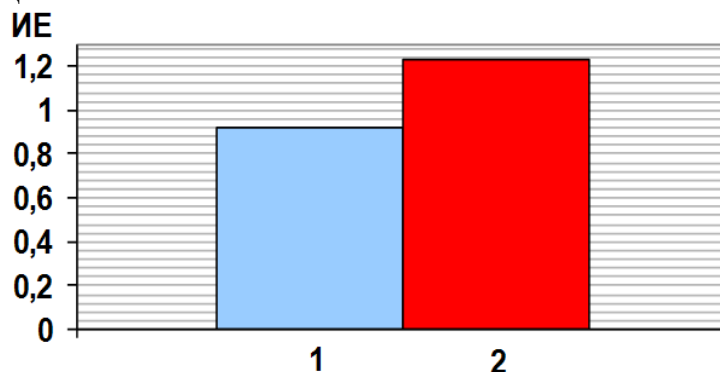


Рис. 7. Трипсин-ингибиторная активность апротинина (1) и соевого ингибитора трипсина (2) в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 нмоль вещества.

Ингибиторная активность синтетических низкомолекулярных ингибиторов на 2 порядка ниже, чем у апротинина, и в 40 раз ниже, чем у СИТ. Учитывая, что молекулярная масса СИТ (20 100) в 3 раза выше, чем у апротинина (6 514), при расчете на моль ингибитора активность первого будет несколько выше (см. рис. 7).

Исследование системы свертывания крови и фибринолиза *in vitro*

В условиях *in vitro* нами было проведено исследование воздействия апротинина, СИТ и трипсина на ряд показателей свертывания крови и противосвертывающей системы. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние апротинина, СИТ и трипсина на показатели свертывания крови и фибринолиза *in vitro*

Показатель	Время, сек			
	Плазма (контроль) (1)	Плазма + 0,1% р-р трипсина (2)	Плазма + 1,0% р-р апротинина (3)	Плазма + 1,0% р-р СИТ (4)
Протромбиновое время	20±0,9	13±0,9 P ₁₋₂ <0,0001	21±0,9 P ₁₋₃ >0,05	31±0,9 P ₁₋₄ <0,0001
АЧТВ	36±1,7	3±0,9 P ₁₋₂ <0,0001	113±1,8 P ₁₋₃ <0,0001	105±2,7 P ₁₋₄ <0,0001
Тромбиновое время	16±0,9	2,5±0,5 P ₁₋₂ <0,0001	24±0,9 P ₁₋₃ <0,0001	∞ *
Время фибринолиза	400±34,7	182±7 P ₁₋₂ <0,0001	Лизиса сгустка не происходило	Лизиса сгустка не происходило

Примечание. * – в некоторых пробах наблюдалось слабое помутнение через 300 секунд. АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время.

Установлено, что протромбиновое время уменьшается на 33-35% при воздействии 0,1% раствора трипсина, незначительно возрастает (не более 5%) при воздействии 1,0% раствора апротинина и увеличивается практически вдвое при воздействии 1,0% раствора СИТ. АЧТВ снижается в 10-12 раз при воздействии 0,1% раствора трипсина, возрастает в 3 раза при воздействии 1,0% раствора апротинина или 1,0% раствора СИТ.

Образование сгустка под действием тромбина (тромбиновое время) усиливается на 85% в присутствии 0,1% раствора трипсина, замедляется на 50% в присутствии 1,0% раствора апротинина и не происходит в присутствии 1,0% раствора СИТ. Фактор XII-калликреинзависимый фибринолиз ускоряется на 50-60% при воздействии 0,1% раствора трипсина и не протекает в присутствии 1% растворов апротинина или СИТ. Результаты исследования указывают на однотипность биологического воздействия апротинина и ингибитора трипсина из соевых бобов в отношении изученных физиологических процессов.

Исследование агрегации тромбоцитов *in vitro*

Исследование проводили на АДФ- и адреналин-иницируемой типах агрегации. Результаты представлены в таблице 3 и на рисунках 8 и 9.

Таблица 3

Влияние апротинина, СИТ и трипсина на агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Тип агрегации	Контроль (плазма) (1)	Плазма + Апротинин (2)	Плазма + СИТ (3)	Плазма + Трипсин (4)
Обрат. (АДФ)				
МА	22±1,8	14±0,9 P ₁₋₂ <0,01	15±0,9 P ₁₋₃ <0,01	34±0,9 P ₁₋₄ <0,01
T _{МА}	55±4,7	55±4,7 P ₁₋₂ <0,3	55±4,7 P ₁₋₃ <0,3	65±15 P ₁₋₄ <0,07
Двухфаз.(АДФ)				
Первая фаза				
МА	48±1,8	35±0,9 P ₁₋₂ <0,01	34±1 P ₁₋₃ <0,01	57±3 P ₁₋₄ <0,01
T _{МА}	85±4,7	68±10,5 P ₁₋₂ <0,001	70±9 P ₁₋₃ <0,005	80±10 P ₁₋₄ <0,08
Вторая фаза				
МА	70±2	56±2 P ₁₋₂ <0,02	58±1 P ₁₋₃ <0,05	99±1 P ₁₋₄ <0,02
T _{МА}	350±9,2	325±9,2 P ₁₋₂ <0,001	320±9,3 P ₁₋₃ <0,001	310±9,2 P ₁₋₄ <0,005
Необрат.(АДФ)				
МА	49±0,9	33±0,9 P ₁₋₂ <0,02	29±0,9 P ₁₋₃ <0,02	100 P ₁₋₄ <0,001
T _{МА}	400±18	410±9,3 P ₁₋₂ <0,04	410±9,3 P ₁₋₃ <0,04	210±26,4 P ₁₋₄ <0,001
Двухфаз.(адр)				
Первая фаза				
МА	23±0,9	16±1,8 P ₁₋₂ <0,02	16±1,8 P ₁₋₃ <0,02	32±0,9 P ₁₋₄ <0,01
T _{МА}	110±9,3	125±13,1 P ₁₋₂ <0,001	125±13 P ₁₋₃ <0,001	130±9,3 P ₁₋₄ <0,0001
Вторая фаза				
МА	47±2,4	44±2 P ₁₋₂ >0,05	44±1,8 P ₁₋₃ >0,05	55±0,9 P ₁₋₄ <0,02
T _{МА}	390±9,3	430±18 P ₁₋₂ <0,0001	430±18 P ₁₋₃ <0,0001	435±16 P ₁₋₄ <0,0003

Примечание. МА – максимальный уровень агрегации (процент светопропускания), T_{МА} – время достижения максимального уровня агрегации в секундах, адр – адреналин, Обрат. – обратимая агрегация, Необрат. – необратимая агрегация, Двухфаз. – двухфазная агрегация.

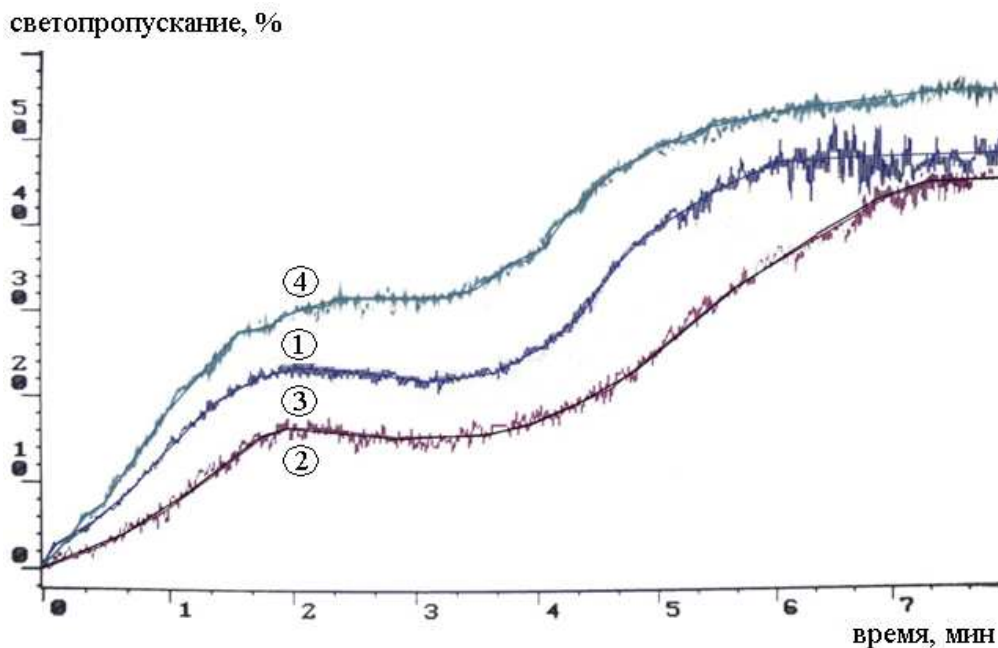


Рис. 9. Типичные агрегатограммы влияния аprotинина, СИТ и трипсина на адреналин-иницируемую двухфазную агрегацию тромбоцитов *in vitro* (адреналина 25 мкмоль). 1 – контроль; 2-3 – СИТ 1,0% (аprotинин 1,0%); 4 – трипсин 0,1%.

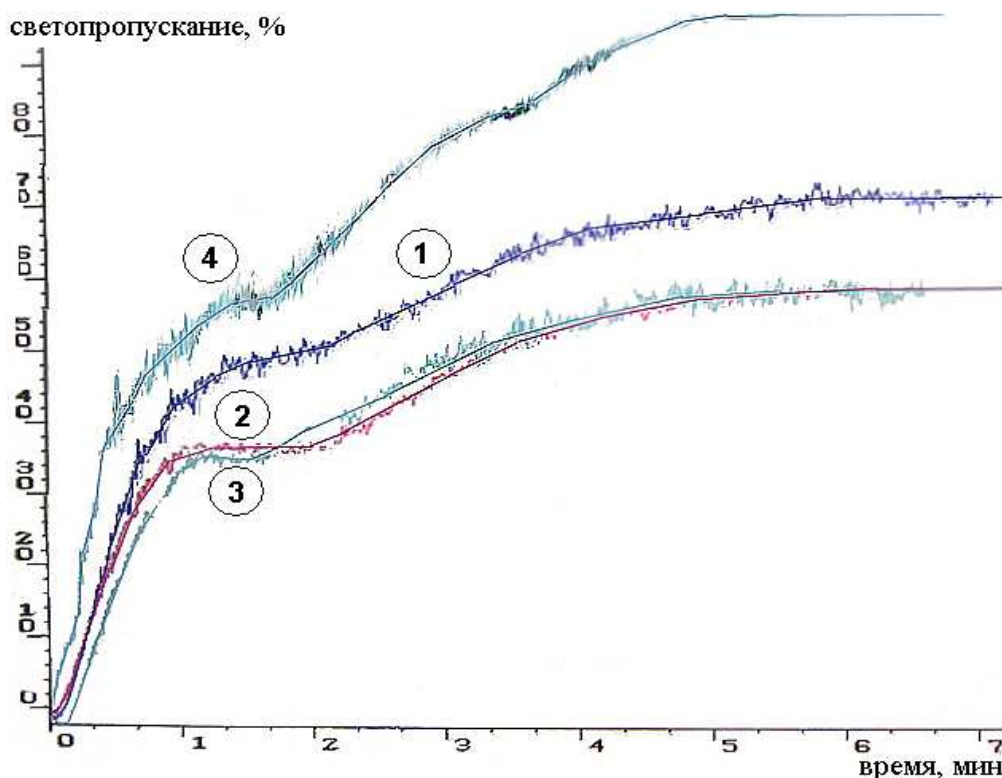


Рис. 8. Типичные агрегатограммы влияния аprotинина, СИТ и трипсина на АДФ-иницируемую двухфазную агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 15 мкмоль). 1 – контроль; 2 – аprotинин 1,0%; 3 – СИТ 1,0%; 4 – трипсин 0,1%.

Ингибиторы факторов свертывания являются на сегодняшний день основным объектом исследования в работах, посвященных регуляции агрегации тромбоцитов (Klauss, Spannagl, 2006; Jennings, Saucedo, 2008). В литературе имеются данные об успешном применении некоторых серпинов как регуляторов агрегации (Rothman, 2005; Nutescu, Shapiro, Chevalier, 2006; Lepor, 2007; Fareed et al., 2008a, 2008b; Hoppensteadt et al., 2008). Мы поставили перед собой задачу исследовать влияние апротинина и СИТ на процесс агрегации тромбоцитов. В ходе исследования было установлено, что апротинин и СИТ тормозят процесс агрегации тромбоцитов *in vitro*, а трипсин оказывает обратный ингибиторам эффект. Антиагрегационные свойства исследуемых ингибиторов протеолитических ферментов практически не отличаются.

Исследование влияния апротинина, СИТ и трипсина на систему комплемента *in vitro*

Ингибиторы протеаз участвуют в различных протеолитических каскадах организма, в том числе в активации комплемента (Silverman et al., 2004; Richardson, Viswanathan, Lucas, 2006). Поэтому одним из объектов данного сравнительного исследования биологической активности панкреатического ингибитора протеаз и соевого ингибитора мы выбрали систему комплемента как протеолитическую систему (рис. 10, табл. 4).

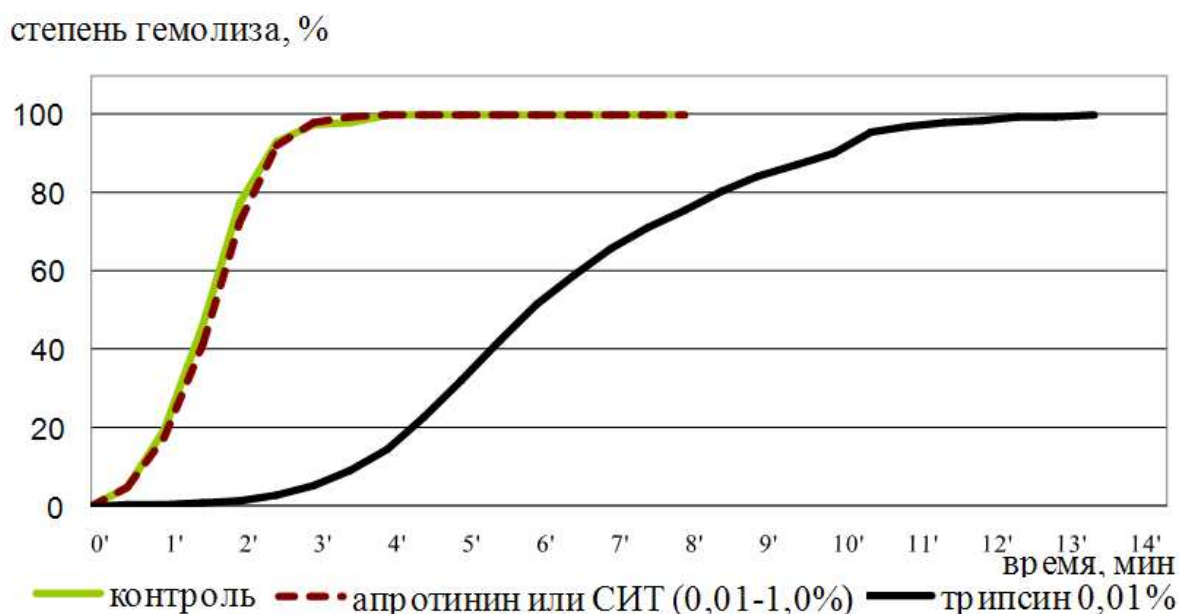


Рис. 10. Типичные кривые влияния апротинина, СИТ и трипсина на гемолитическую активность комплемента *in vitro*.

Таблица 4

Влияние апротинина, СИТ и трипсина на скорость гемолиза эритроцитов в присутствии системы комплемента *in vitro*

	Время лагфазы, мин	Общее время гемолиза включая лагфазу, мин
Контроль (1)	3,5±0,5	8,5±1,5
Апротинин (1,0%) (2)	3,2±0,15 P ₁₋₂ >0,05	7,25±0,25 P ₁₋₂ >0,05
СИТ (1,0%) (3)	3,2±0,15 P ₁₋₃ >0,05	7,25±0,25 P ₁₋₃ >0,05
Трипсин (0,01%) (4)	4,25±0,25 P ₁₋₄ <0,02	15,5±0,5 P ₁₋₄ <0,02

Мы предполагали, что исследуемые ингибиторы смогут препятствовать работе комплемента, тем самым увеличив время гемолиза. Однако было установлено, что скорость гемолиза не изменяется при воздействии апротинина и СИТ. Такой эффект ингибиторов можно объяснить их специфичностью к протеазам. Трипсин угнетает активность комплемента, возможно, потому что компоненты последнего гидролизуются трипсином.

Влияние приема изолята соевого белка на протеолитическую и трипсин-ингибиторную активность в сыворотке крови

В рамках исследования протеолиза, затрагивающего систему крови, мы поставили перед собой задачу выяснить, как длительное употребление в пищу продуктов, содержащих активные ингибиторы протеолитических ферментов, может влиять на протеазно-ингибиторную систему организма человека. В качестве такого продукта был выбран изолят соевого белка, обладающий антипротеолитической активностью. В процессе приготовления изолята соя подвергается термической обработке, в ходе которой биологически активные компоненты могут инактивироваться, в том числе и ингибиторы. Известно, что около 20% соевого ингибитора трипсина обладают термостабильностью (Kennedy, 1998). Поэтому для корректной оценки показателей общей активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в сыворотке крови, было определено содержание ингибиторов в изоляте соевого белка. Определение показало, что 1 мг изолята соевого белка содержит 1,4±0,1 ингибиторных единиц (ИЕ).

Установлено, что прием изолята соевого белка на протяжении 2 месяцев сопровождался статистически достоверным снижением общей протеолитической активности сыворотки крови на 18% ($p < 0,05$) и увеличением трипсин-ингибиторной активности на 21% ($p < 0,01$) (табл. 5).

Таблица 5

Уровень протеолитической и трипсин-ингибиторной активности в сыворотки крови людей, употреблявших изолят соевого белка

Время исследования сыворотки	Показатели сыворотки крови	
	Общая протеолитическая активность (относительные единицы)	Трипсин-ингибиторная активность (ИЕ/мл)
До приема	0,343±0,010	113±3,6
После приема	0,282±0,008 $p < 0,05$	137±5,3 $p < 0,01$

Полученные данные позволяют предполагать, что употребление активных ингибиторов в составе пищевых продуктов может оказывать влияние на физиологические процессы, сопряженные с протеолизом.

ВЫВОДЫ

1. Первичные структуры и спектры биологической активности апротинина и СИТ гомологичны *in silico*.
2. СИТ и апротинин обладают одинаковой трипсин-ингибиторной активностью *in vitro*.
3. СИТ и апротинин в равной степени препятствуют свертыванию крови, фибринолизу и агрегации тромбоцитов. СИТ замедляет время свертывания, протекающего по внешнему и внутреннему пути, а апротинин – только по внутреннему пути.
4. Оба ингибитора полностью блокируют фибринолиз.
5. Апротинин и СИТ обладают антиагрегационными свойствами. Они не отличаются по силе торможения обратимой, двухфазной, необратимой АДФ-иницируемой и двухфазной адреналин-иницируемой агрегации тромбоцитов.
6. Растворы СИТ и апротинина в концентрациях 0,01-1,0% не влияют на скорость и степень комплемент-зависимого гемолизиса *in vitro*.
7. Двухмесячный прием изолята соевого белка, содержащего активный СИТ, снижает общую протеолитическую активность на 18% и увеличивает трипсин-ингибиторную активность на 21% в сыворотке крови человека.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Аникин С.В., **Памирский И.Э.**, Горин А.А., Чекмарев М.В., Димова Е.А. Разработка лекарственного препарата ингибитора протеаз с использованием методов протеомики и биоинформатики // Молодежь 21 века: Шаг в будущее: Материалы VII региональной научно-практической конференции, посвященной 150-летию основания г.Благовещенска. 16-17 мая 2006 г., Благовещенск. Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2006. Книга 2. С. 10-11.
2. **Памирский И.Э.**, Блоцкий Р.А., Штарберг М.А. Отечественные и зарубежные компьютерные программы в создании и прогнозировании свойств новых лекарственных средств // Молодежь 21 века: Шаг в будущее: Материалы VII региональной научно-практической конференции, посвященной 150-летию основания г.Благовещенска. 16-17 мая 2006 г., Благовещенск. Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2006. Книга 2. С. 215-216.
3. **Памирский И.Э.** Отечественные и зарубежные компьютерные программы в создании и прогнозировании свойств новых лекарственных средств // X Международной молодежной школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии: Тез. докл. 12-19 сентября 2006 г., Владивосток. Владивосток: Изд-во ДВО РАН, 2006. С. 34.
4. **Памирский И.Э.**, Блоцкий Р.А., Штарберг М.А. Сравнительное исследование ингибирования трипсина фармацевтическим препаратом «Гордокс» и ингибитором из бобов сои // Молодежь 21 века: Шаг в будущее: Материалы VIII региональной научно-практической конференции. 17-18 мая 2007 г., Благовещенск. Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2007. Книга 1. С. 228.
5. **Памирский И.Э.**, Блоцкий Р.А., Штарберг М.А. Проблемы моделирования первичной структуры белков // Молодежь 21 века: Шаг в будущее: Материалы VIII региональной научно-практической конференции. 17-18 мая 2007 г., Благовещенск. Благовещенск: Изд-во БГПУ, 2007. Книга 2. С. 110.
6. Borodin E., **Pamirski I.**, Shtarberg M., Gorin A., Anikin S., Beloglazova I. Proteolysis, protease inhibitors and soya. In: Studies on Drugs Used in Traditional Therapy // IV Russia and China Medical Forum: Book of Abstract. 10-12 september 2007, Blagoveshchensk. Blagoveshchensk: ASMA, 2007. P. 31-35.

7. **Pamirski I.E.**, Shtarberg M.A., Beloglazova I.G., Borodin E.A. The influence of soy bean trypsin inhibitor on some biologically relevant proteolytic processes *in vitro* and *in vivo* // Book of Abstract, Commemorating 15 years of Russia-Japan Medical Exchange under the guidance of Japan-Russia Medical Exchange Foundation (1992-2007): Book of Abstract. 21-22 september 2007, Blagoveshchensk. Blagoveshchensk: ASMA, 2007. P. 82.
8. **Памирский И.Э.**, Штарберг М.А., Белоглазова И.Г., Бородин Е.А. Влияние трипсина и ингибитора трипсина соевых бобов на свертывание крови, фибринолиз, агрегацию тромбоцитов и гемолитическую активность комплемента *in vitro* // Дальневосточный медицинский журнал. 2008. № 1. С. 98-100.

Выражаю благодарность заведующему кафедры биохимии АГМА, д.м.н., профессору Бородину Евгению Александровичу за руководство и приобретенный опыт, заведующему кафедры физиологии, д.м.н., профессору Григорьеву Роману Николаевичу и к.м.н., доценту Матыщину Анатолию Петровичу за научные консультации, с.н.с. ЦНИЛ АГМА, к.м.н., Штарбергу Михаилу Анатольевичу, к.м.н., Тиханову Виктору Ивановичу, Белоглазовой Ирине Геннадьевне, Корпушиной Людмиле Петровне, Шильниковой Тамаре Михайловне за помощь в проведении лабораторных исследований, Памирскому Эдуарду Павловичу за предоставление необходимой литературы.

Памирский Игорь Эдуардович

АНАЛИЗ СТЕПЕНИ СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
ОДНОТИПНОСТИ ПОЛИВАЛЕНТНОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ,
СОДЕРЖАЩЕГОСЯ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ЖИВОТНЫХ, И
СОЕВОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 20.09.2009. Бумага «Снежинка».
Ризография. Тираж 100 экз. Зак. 732.

Отпечатано в типографии ГОУ ВПО «Амурская государственная
медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального
развития Российской Федерации

675000, Благовещенск, ул. Горького, 95