

Индексы тонуса и реактивности, а также коэффициент асимметрии кровенаполнения статистически значимо не изменились за время применения ортодонтического лечения.

Следовательно, можно говорить о том, что при аномалии прикуса наблюдается изменение гемодинамики по сосудам экстракраниальных артерий, а вследствие ортодонтического лечения брекет-системой, при перемещении зуба и установке правильного положения его в зубной дуге, происходит изменение гемодинамики в лицевой артерии, поверхностной височной артерии, верхнечелюстной артерии.

#### Л и т е р а т у р а

1. Гусева Е.И. Методы исследования в неврологии и нейрохирургии. М.: Нолидж, 2000. 336 с.

2. Зенков Л.Н., Ронкин М.П., Максименко И.М. и др. Функциональная диагностика нервных болезней. М.: Медицина, 1991. 64 с.

3. Кованов В.В., Аникина Т.В. Хирургическая анатомия артерий человека. М.: Медицина, 1974. С. 360.

4. Кунцевич Г.И. Ультразвуковая доплерография сосудов дуги аорты и их ветвей: Мет. рек. М., 1996. 30 с.

5. Никитин Ю.М. Ультразвуковая доплерография в диагностике поражений магистральных артерий головы и основания мозга. М.: Институт неврологии РАМН, 2003. 46 с.

6. Рулье К.Ф. Цит. Давыдовский И.В. Общая патология человека. М., 1969. 19 с.

7. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. М.: Медицина. 1968. 420 с.

8. Susami T., Kuroda T., Amagasa T. // Cleft. Palate Craniofac. J. 1996. Vol. 33, №5. P. 445-449.

9. Yilmaz S., Kiliec A.R., Keles A. // Am. Journal Orthod. Dentofacial Orthop. 2000. Vol. 117, №2. P. 156-163.



УДК 633.1 : 577.1

И.Э. Памирский, М.А. Штарберг, И.Г. Белоглазова, Е.А. Бородин

## **ВЛИЯНИЕ ТРИПСИНА И ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА СОЕВЫХ БОБОВ НА СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ, ФИБРИНОЛИЗ, АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ И ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕМЕНТА IN VITRO**

*Амурская государственная медицинская академия, г. Благовещенск*

Соевые бобы содержат в значительных количествах ингибитор трипсина (СИТ), количество которого составляет до 10% от общего содержания белков [1]. Большая часть СИТ термолабильна и разрушается в процессе термической обработки соевых продуктов [2]. Около 20% СИТ термостабильны и, попадая в составе соевых продуктов в желудочно-кишечный тракт, частично могут всасываться [3]. Ранее нами было установлено, что прием соевых коктейлей здоровыми молодыми людьми на протяжении 2 нед. сопровождался снижением общей протеолитической активности сыворотки крови [4]. С целью ответа на вопрос: на какие протеолитические процессы, протекающие в организме, может оказывать влияние СИТ, в настоящей работе нами проведено исследование влияния очищенного СИТ на свертывание крови, фибринолиз, агрегацию тромбоцитов и гемолитическую активность комплемента в условиях *in vitro*.

#### **Материалы и методы**

В работе использованы СИТ производства «Реанал» (Венгрия) и панкреатический ингибитор трипсина (ПИТ)

— фармацевтический препарат «Гордокс» производства «Гедеон Рихтер» (Венгрия), комплемент лиофилизированный и гемолитическая диагностическая сыворотка жидкая «Эколаб» (Россия). Показатели, характеризующие свертывание крови (тромбиновое время, протромбиновое время, активированное время реакции) и фибринолиз (фибринолиз-тест) определяли с помощью стандартных наборов реактивов общепринятыми в клинической лабораторной диагностике методами. Агрегацию тромбоцитов исследовали на анализаторе агрегации тромбоцитов «Solar AP 2110» кинетическим методом по уменьшению светопоглощения плазмы крови. Кровь забирали у здоровых людей утром натощак из локтевой вены самотеком в силиконированные пробирки. В качестве антикоагулянта использовали 3,8% раствор нитрата натрия, добавляемый к крови в соотношении 1 : 9. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови при 100 g в течение 15 мин. Для получения бестромбоцитарной плазмы, используемой для установок нулевой точки, принимаемой за 100%-ное пропускание, оставшийся после отбора

обогащенный тромбоцитами плазмы осадок повторно центрифугировали при 2000g в течение 15 мин. Эту же плазму использовали для стандартизации (разведения) обогащенной тромбоцитами плазмы до оптимального содержания тромбоцитов —  $200-250 \times 10^9/\text{л}$ . Объем инкубационной смеси — 0,5 мл. Агрегацию тромбоцитов инициировали внесением АДФ или адреналина в конечной концентрации  $2,5-5 \times 10^{-6}$  М. Влияние СИТ и ПИТ на гемолитическую активность комплемента изучали по скорости гемолиза эритроцитов в гемолитической системе в присутствии комплемента. Процесс гемолиза регистрировали на анализаторе агрегации тромбоцитов «Solar AP 2110» по уменьшению оптической плотности гемолитической системы (гемолитическая сыворотка и эритроциты барана) в динамике. За 100%-ное пропускания принимали пробу с полным гемолизом эритроцитов. Инкубационная смесь объемом 3 мл содержала 1,9 мл физиологического раствора, 1 мл гемолитической системы и 0,1 мл комплемента в контрольной пробе. В опытных пробах осуществляли прединкубацию комплемента с трипсином, СИТ или ПИТ в различных конечных концентрациях на протяжении 5 мин. Трипсин-ингибиторную активность СИТ и ПИТ измеряли по замедлению скорости гидролиза БАЭЭ трипсином спектральным методом по поглощению при 253 нм [5].

### Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в таблице результатов исследования влияния трипсина и СИТ на свертывание крови и фибринолиз, добавление к плазме крови трипсина в конечной концентрации 0,1% сопровождается уменьшением в 1,5-2 раза величин протромбинового и тромбинового времени, активированного времени реакции, отражая возрастание скорости свертывания крови под влиянием экзогенной протеазы. Внесение в инкубационную смесь СИТ в конечной концентрации 0,1% оказывает противоположный эффект и приводит к увеличению указанных показателей в 1,5-3 раза. Аналогичное влияние трипсин и СИТ оказывают на фибринолиз. Время растворения тромба (фибринолиз-тест) уменьшается в 2 раза при добавлении трипсина и увеличивается в 2,5 раза при добавлении СИТ. Полученные результаты ясно указывают, что трипсин и СИТ, не имеющие непосредственного отношения

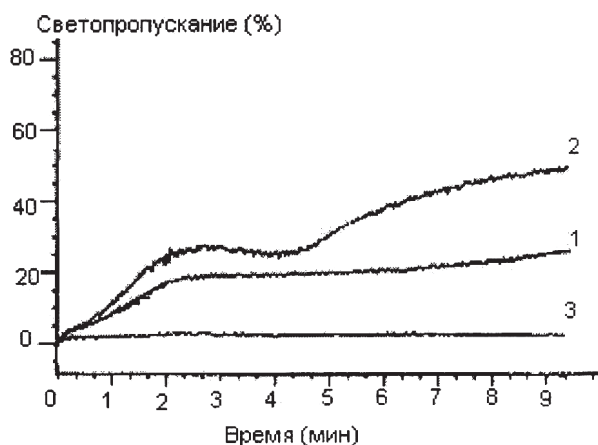


Рис. 1. Влияние трипсина и СИТ на АДФ-иницируемую агрегацию тромбоцитов: кривая 1 — плазма крови; кривая 2 — плазма + трипсин; кривая 3 — плазма + СИТ. Условия получения обогащенной тромбоцитами плазмы крови и регистрации агрегации тромбоцитов

### Резюме

В условиях *in vitro* трипсин увеличивает скорость свертывания крови, фибринолиза, АДФ- и адреналин-иницируемой агрегации тромбоцитов, а соевый ингибитор трипсина замедляет скорость этих процессов. В низких концентрациях трипсин замедляет скорость гемолиза эритроцитов в гемолитической системе в присутствии комплемента, а в более высоких предупреждает гемолиз. Соевый и панкреатический ингибиторы трипсина не влияют на гемолитическую активность комплемента. Соевый ингибитор трипсина не уступает по ингибиторной активности панкреатическому и может явиться основой для создания фармацевтического препарата ингибитора протеаз.

I.E. Pamirsky, M.A. Shtarberg,  
I.G. Beloglazova, E.A. Borodin

### THE INFLUENCE OF TRYPSIN AND SOY BEAN TRYPSIN INHIBITOR ON BLOOD CLOTTING, FIBRINOLYSIS, PLATELETS AGGREGATION AND HEMOLYTIC ACTIVITY OF THE COPPLEMENT IN VITRO

Amur state medical academy, Blagoveshchensk

### Summary

Trypsin increases the rate blood clotting, fibrinolysis, ADP- and adrenaline-initiated platelets aggregation whole soy bean trypsin inhibitor decreases the rate of these processes *in vitro*. In low concentrations trypsin slows down the rate of erythrocyte hemolysis by complement and in higher concentrations totally blocks hemolysis. Both soy bean and pancreatic trypsin inhibitors do not influence the reaction of complement binding. Soy bean trypsin inhibitor has similar inhibitory activity with pancreatic one and may represent basis for the development of pharmaceutical preparation of protease inhibitor.

к процессам гемостаза, могут оказывать влияние на эти процессы, катализируемые высокоспецифичными протеазами. Трипсин их активирует, а СИТ замедляет.

Влияние трипсина и СИТ на агрегацию тромбоцитов весьма схоже с их влиянием на свертывание крови и фибринолиз. Как видно из экспериментальных кривых инициированной АДФ агрегации тромбоцитов, в присутствии трипсина скорость агрегации тромбоцитов возрастает, а в присутствии СИТ снижается (рис. 1). Эффекты трипсина включают увеличение максимальной агрегации, степени агрегации на 5 мин регистрации, уменьшение времени агрегации (время достижения максимальной агрегации) и возрастание начальной скорости агрегации. Эффекты ингибитора трипсина противоположны.

Процессы протеолиза играют важную роль в действии на клетки системы комплемента, ряд компонентов которой относят к классу сериновых протеаз. Поэтому представляло интерес исследовать влияние трипсина, СИТ, а также фармацевтического препарата ингибитора протеаз «Гордокс», действующим началом которого является выделяемый из поджелудочных желез свиней и крупнорогатого скота ПИТ, на гемолитическую активность комплемента.

Прединкубация СИТ и ПИТ с комплементом не оказывает влияния на скорость гемолиза эритроцитов в гемо-

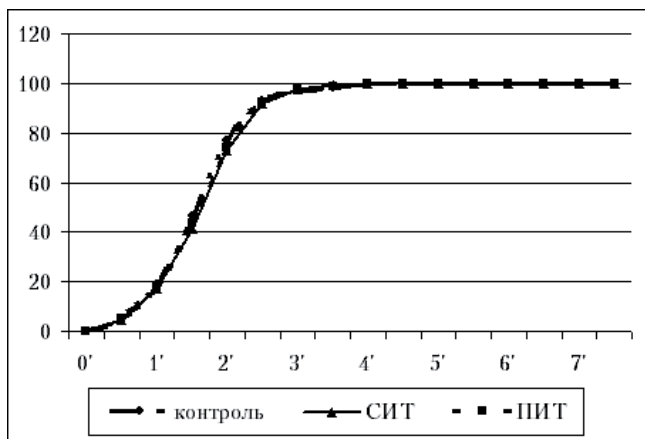
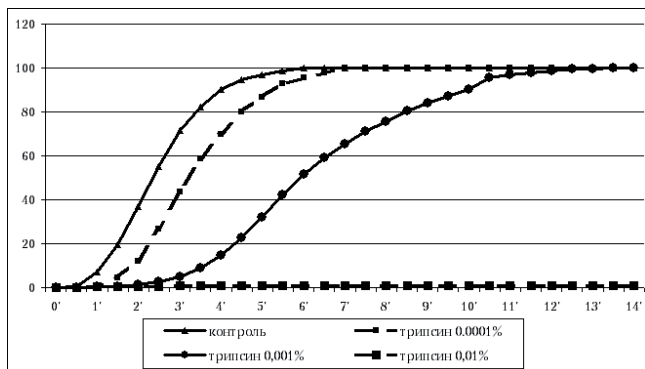


Рис. 2. Влияние трипсина (верхний) СИТ и ПИТ (нижний) на гемолитическую активность комплемента

литической системе в присутствии комплемента (рис. 2). В отличие от этого, прединкубация комплемента с трипсином уменьшает скорость гемолиза эритроцитов при использовании низких концентраций трипсина (конечные концентрации 0,0001 и 0,001%) и полностью подавляет гемолиз при использовании более высоких концентраций (0,01% и выше) (рис. 2). Влияние трипсина на скорость гемолиза эритроцитов проявляется в значительно более низких концентрациях (0,0001-0,001%), чем его влияние на свертывание крови, фибринолиз и агрегацию тромбоцитов (0,01%). Противоположный эффект трипсина на гемолитическую активность комплемента по отношению к его влиянию на реакции гемостаза можно объяснить разрушением трипсином белковых факторов системы комплемента на стадии прединкубации. Отсутствие эффектов СИТ и ПИТ на скорость гемолиза эритроцитов может быть обусловлено различными молекулярными причинами, в частности, независимостью скорости-лимитирующей стадии гемолиза эритроцитов от протеолитических реакций и т.д.

В целом полученные результаты свидетельствуют, что протекающие в организме высокоспецифичные протеолитические процессы могут регулироваться протеазами и ингибиторами протеаз, не имеющими прямого отношения к этим процессам. В частности, трипсин и СИТ *in vitro* оказывают выраженное влияние на процессы гемостаза. В клинике используются препараты ингибиторов протеаз на основе ПИТ, выпускаемые несколькими фирмами с разными торговыми названиями: «Гордокс», «Контрикал», «Тразилол» и др. Существенным недостатком этих препа-

### Влияние трипсина и соевого ингибитора трипсина на свертывание крови и фибринолиз

Показатели крови	Протромбиновое время (с)	Тромбиновое время (с)	Активированное время реакции (с)	Фибринолиз-тест (мин)
Плазма крови	25±1,9	62,3±4,2	88±9,7	15,3±1,9
Плазма+ трипсин	19±1,3 $p_{1,2} < 0,01$	Немедленное образование гелеобразного сгустка	58±4,7 $p_{1,2} < 0,02$	8,7±0,5 $p_{1,2} < 0,005$
Плазма + СИТ	43±4,6 $p_{1,3} < 0,002$	93±9,1 $p_{1,3} < 0,02$	258±17 $p_{1,3} < 0,001$	38±0,9 $p_{1,3} < 0,001$

ратов является характерная для всех препаратов, на основе животных белков, возможность одновременного внесения в организм патогенных вирусов. Согласно литературным данным, трипсин-ингибиторная активность СИТ и ПИТ примерно одинакова и составляет ~3-8 ИЕ/мг ингибитора, в зависимости от степени очистки. При исследовании трипсин-ингибиторной активности имеющихся в нашем распоряжении СИТ и ПИТ ингибиторная активность СИТ в 2 раза уступала таковой ПИТ в расчете на миллиграмм белка и в 1,5 раза превосходила ее в расчете на моль ингибитора с учетом молекулярных масс СИТ (21384 Da) и ПИТ (6511 Da). Способность СИТ влиять на протеолитические процессы, протекающие в организме человека, открывает перспективу создания фармацевтического препарата — ингибитора протеаз на основе СИТ, который был бы лишен указанного недостатка. Реальность подобной перспективы подтверждается протеомным анализом СИТ и ингибиторов сериновых протеаз (серпинов) организма животных и человека, свидетельствующим о высокой степени гомологии СИТ, ПИТ, альфа-1-антитрипсина и антитромбина [5].

### Выводы

1. В условиях *in vitro* трипсин увеличивает, а СИТ замедляет скорость свертывания крови, фибринолиза, АДФ-и адреналин-инициируемой агрегации тромбоцитов.
2. Трипсин замедляет скорость гемолиза эритроцитов в гемолитической системе в присутствии комплемента.
3. СИТ и ПИТ не влияют на гемолиз эритроцитов в аналогичных условиях.
4. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности исследования — возможности создания фармацевтического препарата — ингибитора протеаз на основе СИТ.

### Л и т е р а т у р а

1. Бородин Е.А., Бородина Г.П., Штарберг М.А. и др. // Дальневост. мед. журнал. 2003. №3. С. 14-17.
2. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. // Современные методы в биохимии. М., 1977. С. 188-191.
3. Anderson R.L., Wolf W.J. // J. Nutr. 1995. Vol. 125, №3. P.581-588.
4. Birk Y. // Int. J. Pept. Protein Res. 1985. Vol. 25, №2. P. 113-131.
5. Borodin E., Pamirski I., Shtarberg M. et al. // IV Russia and China Medical Forum. Blagoveshchensk, 2007. P. 31-35.
6. Kennedy A.R. // Pharmacol. Ther. 1998. Vol. 78, P. 167-209.

