

ГОУ ВПО «АМУРСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук, профессор
Бородин Евгений Александрович

Благовещенск – 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
Глава 1. Система протеолиза в организме человека	9
Глава 2. Регуляция протеолиза	23
Глава 3. Исследование высокомолекулярных соединений методами биоинформатики.....	34
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
Глава 4. Материалы и методы.....	37
Глава 5. Исследование апротинина и соевого ингибитора трипсина методами биоинформатики (<i>in silico</i>).....	49
5.1. Обзор компьютерных программ, баз данных и серверов.....	49
5.2. Определение степени гомологии аминокислотных последовательностей ингибиторов.....	54
5.3. Определение спектров биологической активности ингибиторов	56
5.4. Построение электронных третичных структур ингибиторов.....	58
Глава 6. Определение трипсин-ингибиторной активности апротинина и соевого ингибитора трипсина <i>in vitro</i>	60
Глава 7. Исследование влияния апротинина и соевого ингибитора трипсина на протеолитические системы крови <i>in vitro</i>	62
7.1. Исследование свертывания крови и фибринолиза.....	65
7.2. Исследование агрегации тромбоцитов	69
7.3. Исследование системы комплемента	76
Глава 8. Исследование влияния приема изолята соевого белка, содержащего соевый ингибитор трипсина, на уровень общей протеолитической и трипсин-ингибиторной активности в сыворотке крови людей	79
ОБСУЖДЕНИЕ.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

II	второй фактор свертывания крови
III	третий фактор свертывания крови
V	пятый фактор свертывания крови
VII	седьмой фактор свертывания крови
VIII	восьмой фактор свертывания крови
IX	девятый фактор свертывания крови
X	десятый фактор свертывания крови
XI	одиннадцатый фактор свертывания крови
XII	двенадцатый фактор свертывания крови
α_1 -АТ	альфа-1-антитрипсин
α_2 -АП	альфа-2-антиплазмин
α_2 -МГ	альфа-2-макроглобулин
HCl	соляная кислота
SBTI	соевый ингибитор трипсина типа Кюнितца
Asp	аспарагиновая кислота
His	гистидин
Ser	серин
АДФ	динатриевая соль адениндинуклеотиддифостата
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время
БАЭЭ	α -N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
И- α -АТ	интер-альфа-антитрипсин
ИЕ	ингибиторные единицы
ПЭВМ	персональная электронно-вычислительная машина
СИТ	соевый ингибитор трипсина типа Кюнитца
ТАП	тканевый активатор плазминогена
ТИЕ	трипсин ингибиторная единица
УПА	активатор плазминогена урокиназного типа

ВВЕДЕНИЕ

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-инициируемой и двухфазной адреналин-инициируемой 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 белки апротинин и СИТ являются низкогомологичными 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 печенья, обогащенного активным соевым ингибитором».

Предложен метод исследования гемолитической активности системы 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.

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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Система протеолиза в организме человека

Физиологическая роль протеолиза

Протеолиз – это процесс гидролиза пептидных связей, катализируемый протеолитическими ферментами. В организме такому гидролизу подвергаются эндогенные и экзогенные белковые структуры. Традиционно протеолиз считается радикальным путем завершения жизни белков (Marfany et al., 2008), однако его роль в организме более разнообразна. Протеолиз вовлечен во множество четко отрегулированных физиологических процессов от простого переваривания белков пищи до более сложных ферментативных каскадов. Протеолиз белков – это древний механизм, который развился, чтобы управлять мириадами клеточных процессов во всех формах жизни (Urban, Shi, 2008). Благодаря такому механизму, клетки передают информацию из эндоплазматического ретикулума ядру (Rawson, 2002). Протеолиз тесно связан с функционированием систем клеточного гомеостаза (Chondrogianni, Gonos, 2008; Skórko-Glonek, Sobiecka-Szkatuła, 2008), течением ангиогенеза (Seiki, Yana, 2003) и гемопоэза (Horwitz et al., 2003), ключевыми моментами митотического деления клетки (Peters, 2002) и трансляцией ДНК (Li, Ye, 2008), старением организма (Chondrogianni, Gonos, 2008) и апоптозом (Lindstedt, Leskinen, Kovanen, 2004; Radović, Cucić, Altarac, 2008; Salvesen, Riedl, 2008), процессами гемостаза (Cottrell, Coelho, Bunnett, 2002) и т.п. В женском организме протеолиз обеспечивает протекание специфических процессов – овуляции и регрессии желтого тела (Нагорная, 1989). Кроме регуляции множества клеточных процессов, протеолиз устраняет чужеродные белки и обеспечивает клетки аминокислотами (Debigare, Price, 2003).

Систему протеолиза образуют вне- и внутриклеточные высокоспецифичные протеолитические ферменты – протеазы (протеиназы). Протеолитические ферменты организма представлены пятью семействами: аспарагиновыми, цистеиновыми, сериновыми, треониновыми протеазами и металлопротеазами (Puente, Lopez-Otin, 2004; Bühling, Groneberg, Welte, 2006). Протеазы локализованы вне клеток, на их поверхности, а также внутри клеток в пределах специфических субклеточных структур (Bühling, Groneberg, Welte, 2006). Основное количество протеолитических ферментов находится в лизосомах и протеосомах. Важная роль лизосом заключается в поддержании защитной системы клеток. Лизосомальные ферменты содержатся в лейкоцитах и участвуют в расщеплении фагоцитируемых частиц. Разложение основной части белковых структур преимущественно катализировано протеасомами (Chondrogianni, Gonos, 2008). Протеасома – очень сложный комплекс протеаз, предназначенный для проведения эффективного, постепенного и избирательного гидролиза протеиновых субстратов (Tanaka, 2009).

Показателями работы протеолиза в организме являются соотношения протеаз и их ингибиторов (протеазно-ингибиторные индексы). Местное равновесие между ингибиторами протеиназ и протеиназами определяет местную протеолитическую активность ферментов (Hiemstra, 2002). В организме протеолитические ферменты и ингибиторы представляют хорошо сбалансированную систему, которая в условиях патологии сдвигается в сторону протеолитических ферментов (Белова и соавт., 2003). При одном физиологическом состоянии соотношения протеаз и ингибиторов в разных тканях и жидкостях могут отличаться. У практически здоровых людей активность калликреина, α_1 -антитрипсина (α_1 -АТ), α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) в сыворотке крови выше, чем в коже и кожном экссудате (Дюкова, 2004).

Протеолитический распад имеет место не только в нормальных физиологических процессах, но и сопутствует патогенезу. Протеолиз вовлечен в многочисленные заболевания (язвы, эмфизема легких, артриты, болезнь Альцгеймера, пневмосклероз, аневризмы, альвеолиты и другие), включая рак

(Кирпиченко, Гидранович, Шиленок, 2000; Вовчук и соавт., 2001; Bashir, Pagano, 2003; Doherty, Dawson, Mayer, 2003; He, Chen, Zheng, 2004; Lancaster et al., 2005; Wiedow, Meyer-Hoffert, 2005; Akbasheva, 2007; Santos, Moreira, 2007; Al-Majid, Waters, 2008; Nichols, Lagana, Parwani, 2008; Søreide, 2008; Tanaka, 2008). Чрезмерной активации протеолиза способствуют также окислительное воздействие и микробные инфекции (Ефременко, Конторщикова, 2003; Rementer et al., 2005).

Протеолиз можно считать одним из механизмов биологической регуляции гомеостаза. Роль ферментов-протеаз здесь заключается в осуществлении гидролиза двух типов: полного и ограниченного. Путем полного протеолиза происходит деградация и расщепление белков. Разрушению подвергаются ауто- и гетерофагоцитированные, дефектные, поврежденные, мутантные белки (Steinbuch, 1984; Glaumann et al., 1986; Ротанова, 2001). Множественность субстратов белковой природы требует большого количества протеиназ. Для завершения полного гидролиза коротких пептидов – конечную стадию протеолиза – необходимы карбокси- и аминопептидазы, ди- и трипептидазы, всего около трех десятков пептидаз различной специфичности (Степанов, 1998). Несмотря на огромный ряд протеолитических ферментов организма, лишь некоторые протеолитические системы содействуют полному гидролизу белков до аминокислот (Kadowaki, Kanazawa, 2003). Ограниченный протеолиз активируя, инактивируя, модифицируя гормоны, ферменты, биологически активные пептиды, а также поддерживая их необходимый уровень, обеспечивает эндоцитоз, деление клетки, синтез белков, изменение формы клетки, перемещение клеточных органелл, деградацию рецепторов и факторов роста (Мосолов, 1971; Pontremoli, Melloni, 1986; Ротанова, 2001). Доказано участие экзогенных и эндогенных протеаз в формировании иммунного ответа (Веремеенко, Голобородько, 1986; Маянский, Цырендоржиев, Рупакова, 1987). Клеточные протеазы оказывают влияние на гуморальный ответ (Redini et al., 1998). Реакции ограниченного протеолиза также лежат в основе функционирования таких важнейших

физиологических систем как ренин-ангиотензиновая, калликреин-кининовая, гемостаз и других. Частный случай ограниченного протеолиза – фибринолиз. Таким образом, протеолиз, осуществляя деструктивную и регуляторную функции, является частью механизма поддержания постоянства внутренней среды организма. Исследования функций и роли протеолитических ферментов в регуляции гомеостаза не прекращаются и по сегодняшний день (Doucet, Overall, 2008).

Протеолитические ферменты крови и ткани

В современной номенклатуре выделяют семь классов (кланов) протеолитических ферментов: а) аспарагиновые; б) цистеиновые; в) глутаминовые; г) металлопротеазы; д) сериновые; е) треониновые; ж) смешанные. Цистеиновые протеазы являются наиболее химически близкими к типу сериновых протеаз (Puente, Lopez-Otin, 2004). Малоизученные протеазы относят в отдельную группу ферментов с неизвестными свойствами. Протеолитические ферменты также называют протеазами, протеиназами, пептидазами и гидролазами. В основе их классификации лежит строение активного, или каталитического, центра (Bühling, Groneberg, Welte, 2006). Протеазы со сходными по структуре каталитическими центрами объединяют в классы, хотя пространственная структура ферментов одного класса нередко оказывается очень разной (Степанов, 1998). Выявив специфические ингибиторы для протеазы, можно более точно отнести ее к одному из классов.

В систему протеолиза организма человека входит большое количество разнообразных протеолитических ферментов из пяти классов (рис. 1). На сегодняшний день известно, что в геноме человека представлены гены 561 протеазы (табл. 1), составляющих так называемую «деградому» (Puente, Lopez-Otin, 2004). Одним из основных источников протеаз крови являются

нейтрофилы, мононуклеарные клетки и тромбоциты (Соловьева, Волкова, 1990).

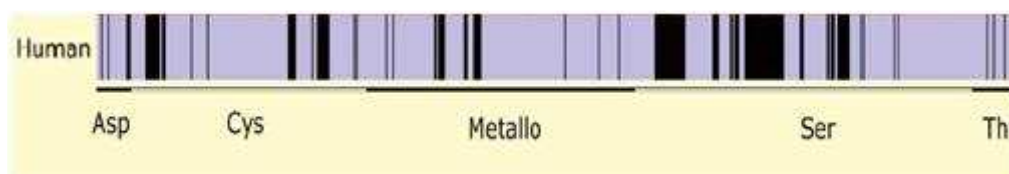


Рис. 1. Соотношение протеаз разных классов у человека (Puente, Lopez-Otin, 2004):

Asp – аспарагиновые; Cys – цистеиновые; Metallo – металлосодержащие; Ser – сериновые; Thr – треониновые.

Таблица 1

Распределение генов протеаз в геномах крысы, мыши и человека (Puente, Lopez-Otin, 2004)

Объект	Класс протеаз					
	всего	Asp	Cys	Metallo	Ser	Thr
Крыса	626	24	160	192	221	29
Мышь	641	27	163	198	227	26
Человек	561	21	148	186	178	28

Примечание. Asp – аспарагиновые, Cys – цистеиновые, Metallo – металлосодержащие, Ser – сериновые, Thr – треониновые.

Класс аспарагиновых протеаз представлен эндопептидазами, которые распределены на 14 семейств. Другое название аспарагиновых протеаз – карбоксильные, или кислые протеазы. Типичной протеазой данного класса белков является пепсин из одноименного семейства. Пепсин известен как фермент, гидролизующий пищевые белки в желудке позвоночных животных. Другие, не менее известные представители аспарагиновых протеаз, белки катепсины D и E, участвуют в регуляции клеточных функций (Kuester et al., 2008).

Класс цистеиновых протеаз (они же тиоловые, или сульфгидрильные протеазы) насчитывает 59 семейств. В основном это эндопептидазы и несколько экзопептидаз. Катепсины выполняющие внутри- и внеклеточные функции, наиболее типичные представители этого класса протеаз, обнаружены в человеческом организме (Kuester et al., 2008).

Металлосодержащие протеазы распределены на 56 семейств. В организме человека найдены в основном представители семейства аминопептидаз. Среди металлопротеаз имеется ряд трансмембранных белков, играющих важную роль в регуляции фенотипа клетки (Edwards, Handsley, Pennington, 2008).

Класс треониновых протеаз состоит из 6 семейств, представленных преимущественно терминальными и самопревращающимися гидролазами. Треониновые протеазы вырабатываются лейкоцитами (моноциты, нейтрофильные гранулоциты) обеспечивая работу защитного механизма – фагоцитоза. Наследственный дефицит некоторых протеаз данного класса лежит в основе лизосомальных болезней у людей.

Класс сериновых протеаз включает 31 семейство. Сериновые протеазы участвуют в протеолитическом регулировании гемопоеза (Horwitz et al., 2003). Представители семейства каспаз находятся в большинстве клеток животных, и составляют основную часть среди протеаз, которые являются факторами апоптоза (Salvesen, Riedl, 2008). Уникальным семейством считаются ромбоиды – внутримембранные сериновые протеазы, которые распределены в пределах плоскости мембраны, и подвергают гидролизу субстраты внутри или около трансмембранных областей. Недавно доказано, что ромбоиды управляют многими важными клеточными функциями (Freeman, 2008). Среди сериновых протеаз наиболее типичными и известными представителями являются трипсин, химотрипсин, тромбин, энтеропептидаза, урокиназа, эластаза, калликреины плазмы и крови, некоторые факторы свертывания крови. Энтеропептидаза – пищеварительный фермент, превращает трипсиноген в трипсин, а также гидролизует белки пищи. Трипсин и химотрипсин содержатся в секрете поджелудочной железы человека и участвуют в

расщеплении белков пищи в тонком кишечнике. Трипсин, являясь активатором основных панкреатических ферментов, запускает весь каскад ферментных реакций пищеварения. Урокиназа вырабатывается почками и участвует в растворении тромбов крови, через активацию плазмина. Эластаза – это фермент поджелудочной железы, способный расщеплять эластин, коллаген и другие структурные элементы соединительной ткани, а также белки плазмы крови. Калликреины являются протеазами плазмы крови и тканей и катализируют реакцию отщепления физиологически активных кининов от кининогена. Калликреины также вызывают хемотаксис и агрегацию нейтрофилов. Ряд представителей сериновых протеаз входят в систему свертывания крови и фибринолиза (активаторы плазминогена, плазмин, тромбин, фактор X и другие).

Природа и механизм действия сериновых протеаз

По химической природе сериновые протеазы являются белками. Протеазы имеют центр связывания с субстратом и активный, или каталитический, центр, который осуществляет гидролиз пептидных связей субстрата. Для всех сериновых протеаз характерно одинаковое строение каталитического центра (рис. 2) и носит название «сериновый сайт» (Фершт, 1980). Каталитический центр представляет собой каталитическую триаду – «систему с переносом заряда», – где His57 связан водородной связью с карбоксильной группой Asp102, а имидазольным кольцом повышает реакционную способность Ser195 (Perona, Craik, 1999). Протеазы в организме синтезируются в неактивном состоянии в виде предшественников. Переход предшественника в активную форму происходит путем ограниченного протеолиза его белковой цепи. В этот момент пространственная структура полипептидной цепи предшественника изменяется, и происходит сближение аминокислотных остатков формирующих активный центр.

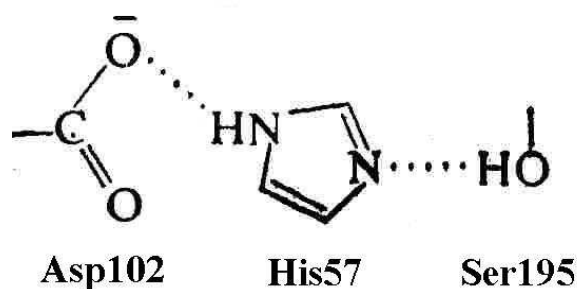


Рис. 2. Активный (каталитический) центр сериновых протеаз (Фершт, 1980):

Asp – остаток аминокислоты аспарагина; His – остаток аминокислоты гистидина; Ser – остаток аминокислоты серина. Числа 57, 102 и 195 показывают порядковый номер аминокислотного остатка в полипептидной цепи протеазы.

Центр связывания протеаз состоит из ряда подцентров, расположенных на поверхности ферментов (рис. 3). Первичный подцентр – это четко выраженная впадина, или «карман», связывающий ароматические боковые цепи субстратов, остальные подцентры представляют собой небольшие желобки и выемки (Фершт, 1980).

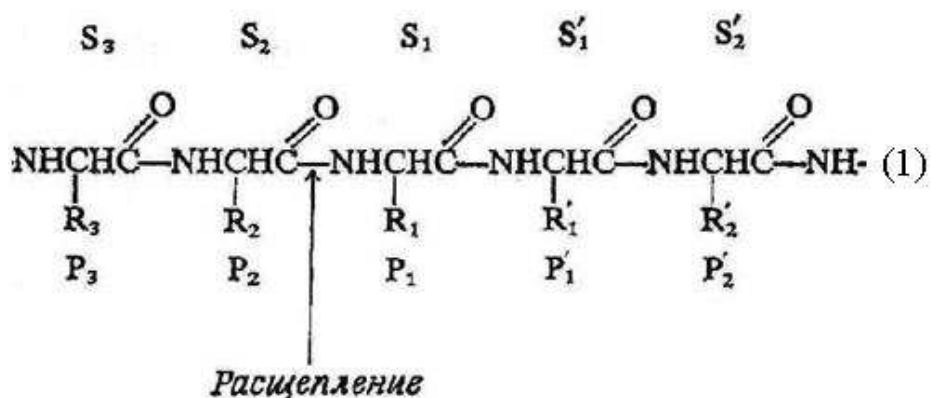


Рис. 3. Центр связывания сериновых протеаз (Фершт, 1980):

(1) – часть полипептидной цепи субстрата; P – аминокислотные остатки полипептидной цепи протеазы, R – радикальные группы аминокислотных остатков субстрата; S – подцентры связывания протеазы.

Сериновые протеазы функционируют по механизму нуклеофильного катализа (Гинодман, 2000). Выделяют три стадии гидролиза белковых субстратов: а) контролируемая диффузия – образование нековалентного

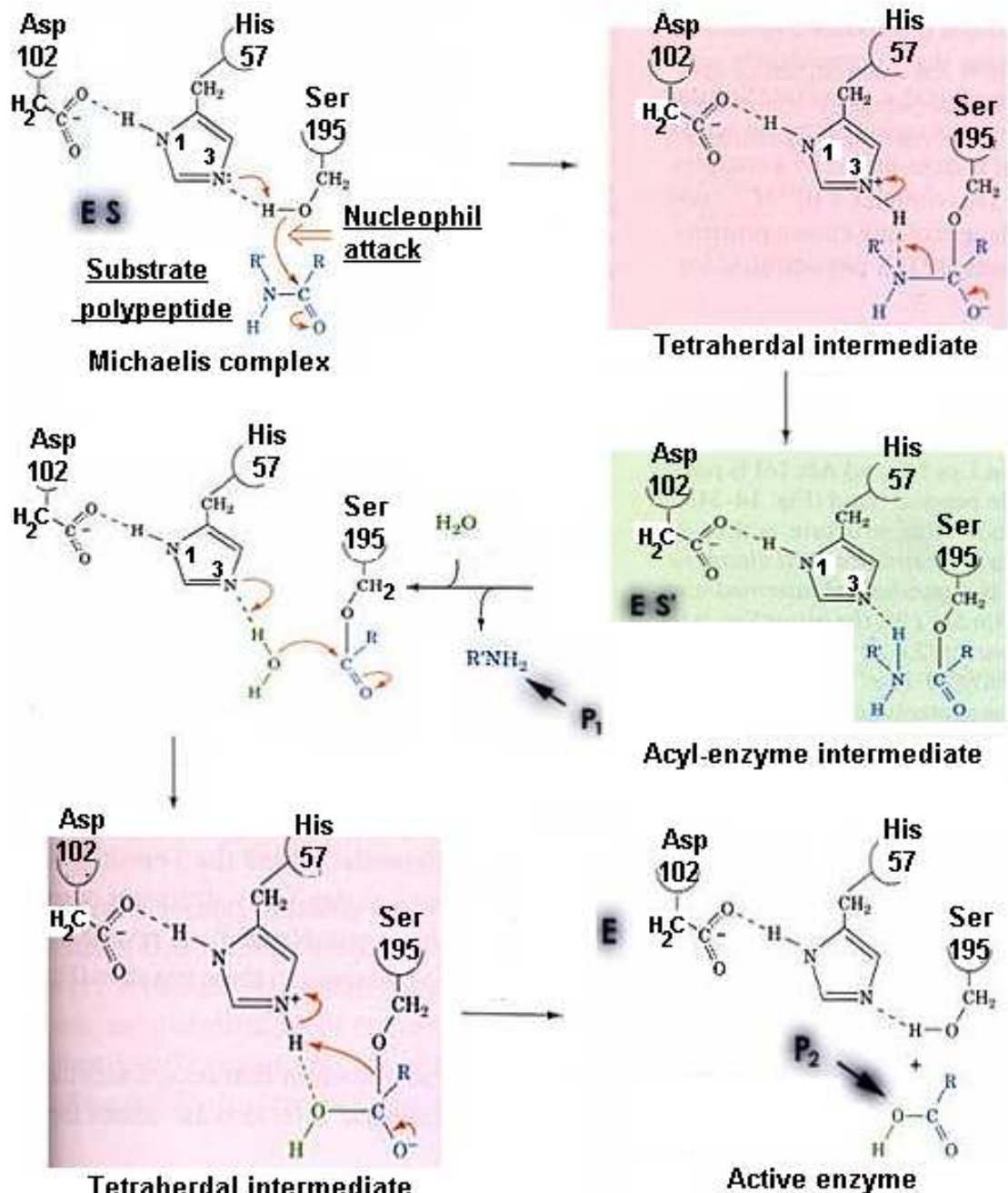


Рис. 4. Механизм действия каталитического центра сериновых протеаз на пептидные связи белковых субстратов (Voet, Voet, 1995):

Asp – остаток аминокислоты аспарагина; E – фермент; S – субстрат; ES и ES' – фермент-субстратные комплексы; His – остаток аминокислоты гистидина; P1 – аминная часть амидного субстрата; P2 – карбоновая кислота; Ser – остаток аминокислоты серина. Числа 57, 102 и 195 показывают порядковый номер аминокислотного остатка в полипептидной цепи протеазы.

комплекса E^*S (E – фермент, S – субстрат) с высокой скоростью; б) ацилирование – ацильная группа S переносится на гидроксил E, и одновременно образуется первый продукт P_1 (аминная часть амидного S); в)

деацилирование ацилфермента (собственно гидролиз) – разрыв сложноэфирной связи с образованием исходного активного фермента и второго продукта P_2 (карбоновая кислота).

Механизм взаимодействия каталитического центра трипсиноподобных протеаз с субстратом изображен на рисунке 4. Мишенями сериновых протеаз в основном являются пептидные связи, образованные остатками лизина и аргинина, а также эфиры и амиды этих аминокислот (Дэвени, Гергей, 1976; Фершт, 1980). В то же время протеазы данного класса обладают разной субстратной специфичностью. Например, трипсин атакует преимущественно денатурированные белки (Никулин, Никулин, 1989). Нативные белки либо вовсе не атакуются трипсином, либо гидролизуются крайне медленно (Веремеенко, 1971; Фершт, 1980). Трипсиноподобный фермент калликреин обладает помимо эстеразной и протеазной, также кенингеназной активностью (Мизулин, 1995). Недавно открытая сериновая протеаза дуоденаза, являющаяся пищеварительным энзимом, обладает свойствами трипсина и химотрипсина (Гладышева и соавт., 2001). Однако большинство родственных трипсину ферментов намного более специфичны, чем сам трипсин (Шульц, Ширмер, 1982). Часть сериновых протеолитических ферментов способны отделять терминальные аминокислоты белковой цепи (экзопептидазы), другие атакуют пептидные связи внутри белка (эндопептидазы). Гидролиз завершается активацией белка (ограниченный протеолиз), либо потерей функции белкового субстрата, в связи с его частичным или полным распадом (неограниченный протеолиз). Сериновый протеолиз белков лежит в основе ферментативных каскадных реакций многих физиологических процессов.

Сериновые протеазы и протеолитические системы организма

При участии трипсиноподобных протеиназ происходит активация кининовой системы, свертывающей и фибринолитической систем, системы

комплемента и других систем (Акбашева и соавт., 2000). Основными компонентами данных протеолитических систем организма человека также являются сериновые протеазы. Например, система гемостаза представляет собой совокупность сложных протеолитических каскадов – образования тромбоцитарного тромба (первичный, или сосудисто-тромбоцитарный гемостаз), свертывания крови (вторичный, или коагуляционный гемостаз) и распада фибринового сгустка (фибринолиз), обеспечивающих сохранение жидкого состояния крови, предупреждение и остановку кровотечений, а также целостности кровеносных сосудов. Образование тромбоцитарного тромба включает следующие этапы: адгезия тромбоцитов (прилипание тромбоцитов к компонентам субэндотелия или к чужеродной поверхности), активация тромбоцитов, или фаза набухания (изменение тромбоцитов из дисковидной в сферическую форму и высвобождение из них стимуляторов агрегации), и агрегация тромбоцитов (слипание тромбоцитов между собой). Фазы образования белого тромбоцитарного тромба под действием АДФ показаны на рисунке 5. Сосудисто-тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз тесно взаимосвязаны – активированные тромбоциты ускоряют процесс свертывания, а продукты свертывания активируют тромбоциты.

Свертывание крови также протекает в несколько стадий. Начальная стадия свертывания крови может проходить по внешнему и внутреннему пути (Иванов, Пучков, 2007). Оба пути сходятся в одной точке – активации фактора свертывания X (протромбиназы). Далее свертывание идет по общему пути, где активный фактор X превращает протромбин в тромбин, который в свою очередь катализирует образование фибрина из фибриногена. В результате заключительной стадии свертывания образуется полимерный нерастворимый фибрин являющийся основой кровяного сгустка. В ходе этих процессов протекают многоэтапные реакции активации факторов свертывания по механизму ограниченного протеолиза с образованием активных трипсиноподобных сериновых протеаз (Butenas, Mann, 2002). Активные формы факторов свертывания крови XII (фактор Хагемана), XI (антигемофильный

глобулин С), X (фактор Стюарта-Прауэра – протромбиназа), IX (фактор Кристмаса – антигемофильный глобулин В), VII (проконвертин), II (протромбин), фактор Флетчера (прекалликреин), фактор III (тканевый активатор плазминогена, тканевый тромбопластин) являются сериновыми протеазами. Фактор свертывания X, тромбин и плазмин, наиболее важные ключевые энзимы системы крови и являются основными объектами исследований гемостаза (Потетина и соавт., 2001; Maignan, Mikol, 2001; Arbogast, 2004).

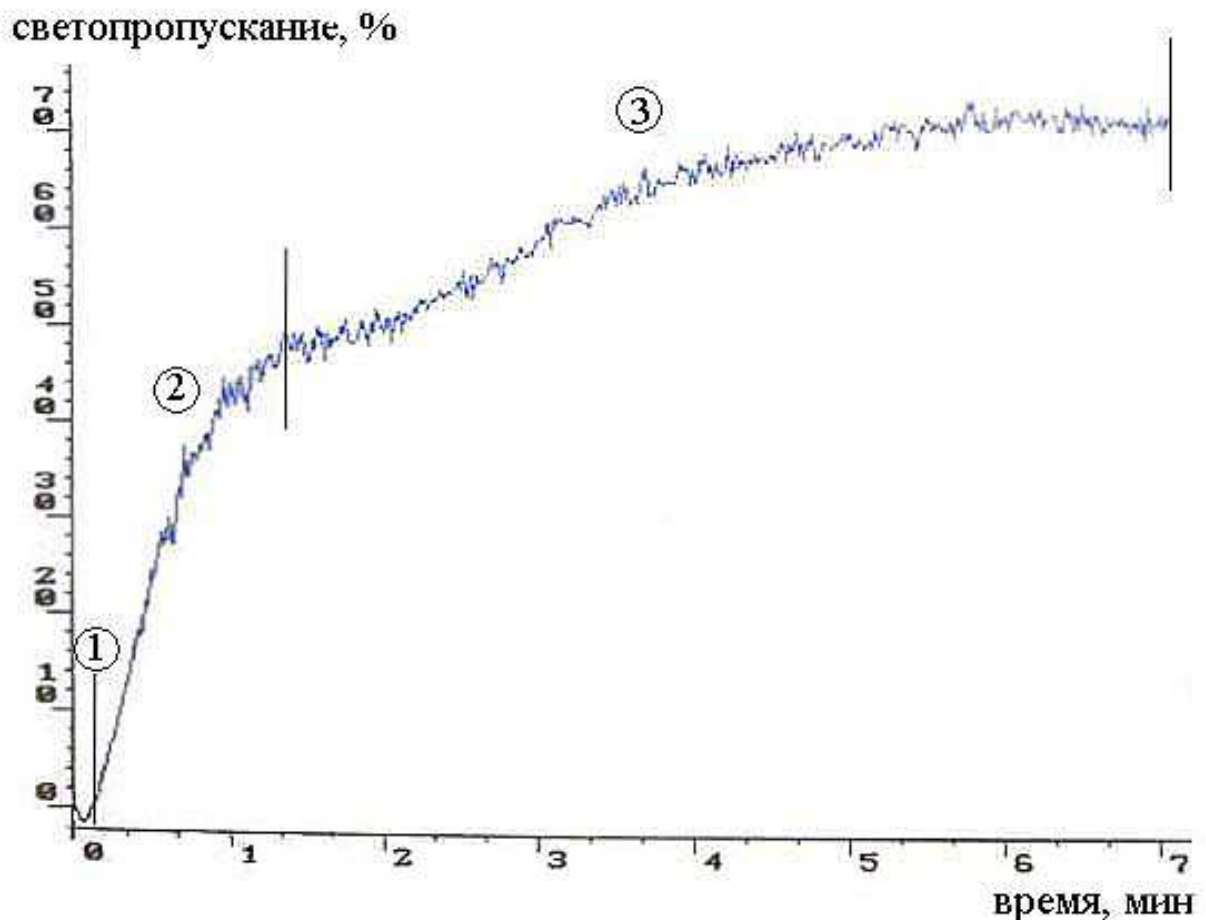


Рис. 5. Этапы образования тромбocyтарного тромба на примере АДФ-инициируемой двухфазной агрегации (инструкция к анализатору агрегации тромбоцитов AP 2110):

1 – фаза активации тромбоцитов (фаза набухания); 2 – фаза первичной агрегации; 3 – фаза вторичной агрегации.

В организме одновременно со свертывающей системой крови функционирует система фибринолиза, в результате работы которой происходит

распад сгустка фибрина. Активаторами фибринолиза выступают сериновые протеазы: тканевый активатор плазминогена и активатор урокиназного типа (Zorio et al., 2008). Активатор урокиназного типа является ключевым ферментом фибринолитической системы (Shetty et al., 2008). Под действием активаторов из плазминогена образуется плазмин, катализирующий гидролитический распад фибринового сгустка и отдельных молекул фибрина. Современные научные знания о системе гемостаза позволяют рассматривать ее как один из важных составных компонентов комплекса защитных реакций организма (Пучков, Иванов, 2007).

Другой важной протеолитической системой организма является система комплемента. Комплемент человека представляет собой многокомпонентную функциональную систему, включающую около 35 узкоспецифичных сывороточных белков (Sim, Tsiftoglou, 2004), которые составляют около 4% от всех белков плазмы крови (Грицюк, Кузнецова, 2005). Белки комплемента участвуют в распознавании, очистке или уничтожении (прямым лизисом) микроорганизмов или изменившихся в следствии апоптоза или некроза клеток (Sim, Tsiftoglou, 2004; Rooijackers, van Strijp, 2007). Часть основных белков системы комплемента являются сериновыми протеазами.

Не менее сложная калликреин-кининовая система включает предшественников кининов (кининогены) и калликреины ткани и плазмы. Калликреин-кининовая система является внутренним метаболическим каскадом, запуск которого завершается образованием вазоактивных кининов (Moreau et al., 2005). Калликреины – ферменты класса сериновых протеаз, катализируют превращение кининогена в кинины.

Протеолитические системы организма имеют многочисленную взаимосвязь между собой и другими важными метаболическими магистралями с многочисленными посредниками, рецепторами и многофункциональными энзимами (Moreau et al., 2005; Ribeiro-Oliveira et al., 2008). Исследование механизмов регулирования вышеперечисленных физиологических систем, сопряженных с работой сериновых протеаз, проводилось более 50 лет и

продолжается по сегодняшний день (Pengo, 2005; Kandzari, 2006; Klauss, Spannagl, 2006; Пашин и соавт., 2007; Casterella, Tchong, 2008; Nutescu, Shapiro, Chevalier, 2008; Prechel, Walenga, 2008).

Итак, протеолиз играет важную роль в поддержании гомеостаза на разных уровнях. В организме протеолитические ферменты обеспечивают протекание адаптационных процессов, неспецифических гуморальных и клеточных защитных механизмов и другое. Во многих протеолитических системах организма человека (свертывание крови, фибринолиз, комплемент, калликреин-кининовая система) основные компоненты представлены протеолитическими ферментами класса сериновых протеаз. Поддержание ингибиторного потенциала организма является основой регуляции работы протеолитических систем. Очевидно, что исследование закономерностей и механизмов регуляции физиологических процессов, сопряженных с протеолизом, является актуальной задачей для современной физиологии.

Глава 2. Регуляция протеолиза

Регуляторы протеолиза (ингибиторы)

Процесс протеолиза регулируется специфическими белками ингибиторами протеаз. Контролируя деятельность внутри- и внеклеточных протеаз ингибиторы поддерживают физиологические функции организма (Richardson, Viswanathan, Lucas, 2006; Suzuki, 2008; Zavasnik-Bergant, 2008). У растений ингибиторы включены в фитоиммунную систему, защищая от протеаз паразитов (Дунаевский и соавт., 2005; Rashed, Macdonald, Matthews, 2008). Способностью ингибировать протеолитические ферменты обладают некоторые вещества небелковой природы, в том числе и синтетические. Общая классификация ингибиторов представлена в таблице 2.

Таблица 2

Классификация ингибиторов протеолитических ферментов (Сыновец, Левицкий, 1985)

Ингибиторы	Естественные	Низко-молеку-лярные	Неспецифические		Переокиси; соли тяжелых металлов		
			Специфические		Пепстатин; химостатин; фосфорамидон; лейпептин; эластиналь; антипаин и др.		
		Высоко-молеку-лярные	Небел-ковые	Мукополисахариды; полианионы; гиалуроновая кислота; гепарин и др.			
			Белко-вые	Живот-ные	Секреторные и тканевые ингибиторы типа Казалья и Кюнитца-Нортропа; овоингибиторы; микробные.		
				Раститель-ные	Ингибиторы типа Кюнитца и Боумана-Бирка (бобовые, злаковые, клубневые растения).		
	Синтетичес-кие	ε-аминокапроновая кислота, пара-аминометилбензойная кислота, габексат, аминотетрациклогексанкарбоновая кислота и др.					

Современная номенклатура подразделяет белковые ингибиторы на 33 класса и 63 семейства, представители которых найдены в более чем 1500 организмах. Девять семейств включают ингибиторы растительного

происхождения (Мосолов, Валуева, 2005). По механизму действия ингибиторы делят на обратимые и необратимые.

В организме человека обнаружены ингибиторы из разных семейств: секретогранин, цистатин, ингибитор кальпастина, сарвивин, α_2 -МГ, латексин и другие. Наиболее хорошо изучен белок фракции α_2 -глобулинов α_2 -МГ. α_2 -МГ ингибирует калликреины плазмы, а также ограничивает субстратную специфичность трипсина, химотрипсина, плазмина, тромбина, эластазы, катепсинов, коллагеназы. В таблице 3 приведено содержание некоторых ингибиторов в плазме и сыворотке крови.

Таблица 3

Содержание ингибиторов протеаз в сыворотке и плазме крови

Ингибитор	Содержание в сыворотке крови мг/100 мл (Веремеенко, 1971)	Содержание в плазме крови (Steinbuch, 1979)
α_1 -АТ	210-500	2-4 г/л
И- α -АТ	10-30	200-700 мг/л
α_1 -АХ	14-35	300-600 мг/л
Антитромбин	-	230 $\pm$ 35 мг/л
α_2 -АП	-	850 мг/л
α_2 -МГ	-	2,6-3,3 г/л
СI-ингибитор	-	250 мг/л

Плазма человека содержит около 10% ингибиторов от общей массы плазменных белков (Khan, Salman, Ahmed, 2002). Мощный антипротеазный потенциал образован в основном за счет серпинов, врожденный дефицит которых обуславливает ряд серьезных заболеваний (Bas et al., 2007; Davis, Cai, Liu, 2007; Muszyńska, Janocha, Fal, 2008; Tirado-Conde, Lara, Miravittles, 2008; Zuraw, Christiansen, 2008). Геном человека кодирует, по крайней мере, 35 серпинов (Silverman et al., 2004), которые составляют 2% от всех белков плазмы (Щербак, 2005). Серпины (**SER**ine **P**rotease **I**Nhibitor) образуют суперсемейство 14 структурно подобных и функционально разнообразных белков (Silverman et al., 2001). Типичными представителями серпинов являются α_1 -АТ, α_2 -АП,

антитромбин, C1-ингибитор, ингибиторы активаторов плазминогена, нейросерпин, бикунин.

α_1 -АТ – гликопротеид, обеспечивающий 70% всей антитриптической активности сыворотки или плазмы (Щербак, 2005). Участвует в регуляции процессов гемостаза и активации комплемента (Гладышева и соавт., 2001). Данный ингибитор эффективно подавляет активность трипсина, химотрипсина, плазмина, тромбина, эластазы, калликреина, бактериальных протеиназ.

α_2 -АП основной регулятор активации агрегации тромбоцитов. Участвует в фибринолизе, снижая активность плазмина.

Ингибиторы активаторов плазминогена представлены тремя типами гликопротеидов (Zorio et al., 2008), которые являются ключевыми компонентами фибринолитической системы (Shetty et al., 2008). Среди них – физиологические ингибиторы активаторов плазминогена УПА и ТАП (Dupont et al., 2008).

Нейросерпин человека играет ключевую роль в развитии и работе нервной системы (Ricagno et al., 2009).

C1-ингибитор является основным ингибиторным белком системы комплемента и обладает противовоспалительным свойством (Wagenaar-Bos, Hack, 2006; Wouters et al., 2008).

Плацентарный серпин бикунин тормозит действие непосредственных и косвенных участников (плазмин, калликреины плазмы и ткани, факторы свертывания XI, IX, VII, X и XII) внутреннего пути свертывания крови и фибринолиза.

Гомологи серпинов обнаружены в бактериях, археях, эукариотах, а также нескольких эукариотных вирусах (Silverman et al., 2004). Белки ингибиторы из других семейств, обладающие свойствами серпинов, широко распространены в растениях (Цыбина и соавт., 2004). Например, в соевых бобах присутствуют ингибиторы семейств Боумана-Бирка и Кюнитца (Csáky, Fekete, 2004). Недавние исследования показали, что белки из семян гречихи, пшеницы,

люпина, ржи, перца, горчицы, картофеля являются эффективными ингибиторами трипсиноподобных протеаз (Цыбина и соавт., 2004; Дунаевский и соавт., 2005; Сперанская и соавт., 2006).

Серпины подавляют преимущественно активность сериновых протеиназ и в меньшей степени цистеиновых. Ингибирование сериновых протеаз основано на прочном связывании ингибитора с ферментом (рис. 6), однако механизм расшифрован не полностью (Гладышева и соавт., 2001; Silverman et al., 2001; Janciauskiene, 2001).

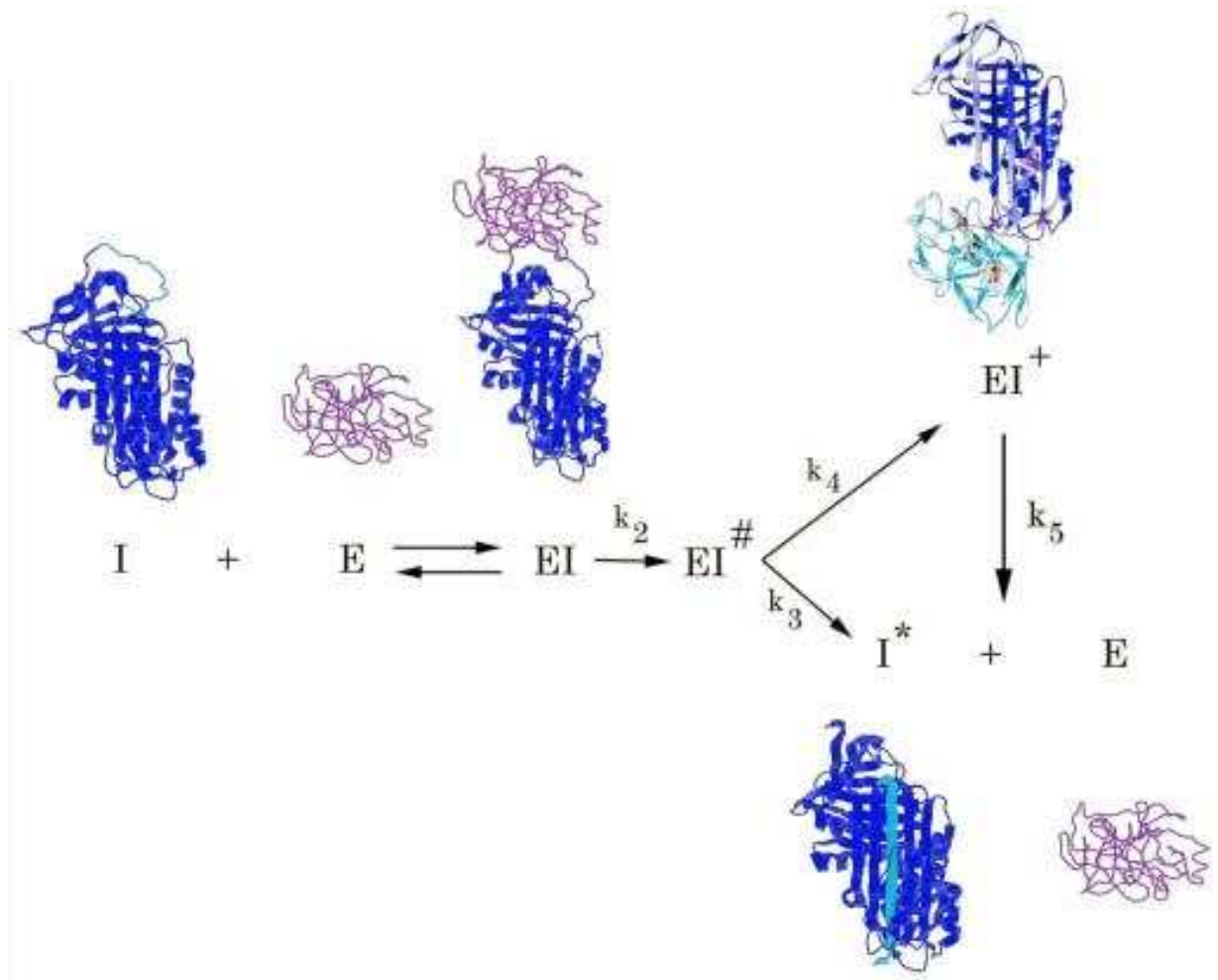


Рис. 6. Образование и судьба комплекса серпин-протеаза (Silverman et al., 2001)

Серпин (I) нековалентно связывается с протеазой (E) с образованием протеазно-ингибиторного комплекса, подобно комплексу Михаэлиса (EI), при этом конформационных изменений полипептидных цепей ингибитора и фермента не происходит. Вследствие гидролиза пептидной связи ингибитора образуется промежуточный ацилэнзим ($EI^\#$), что приводит к формированию ковалентного комплекса (EI^+ , ингибиторный путь), либо расщеплению серпина (I^*), и дальнейшему освобождению протеазы (неингибиторный, или субстратный, путь). Перепечатано с разрешения Cold Spring Harbor Laboratory.

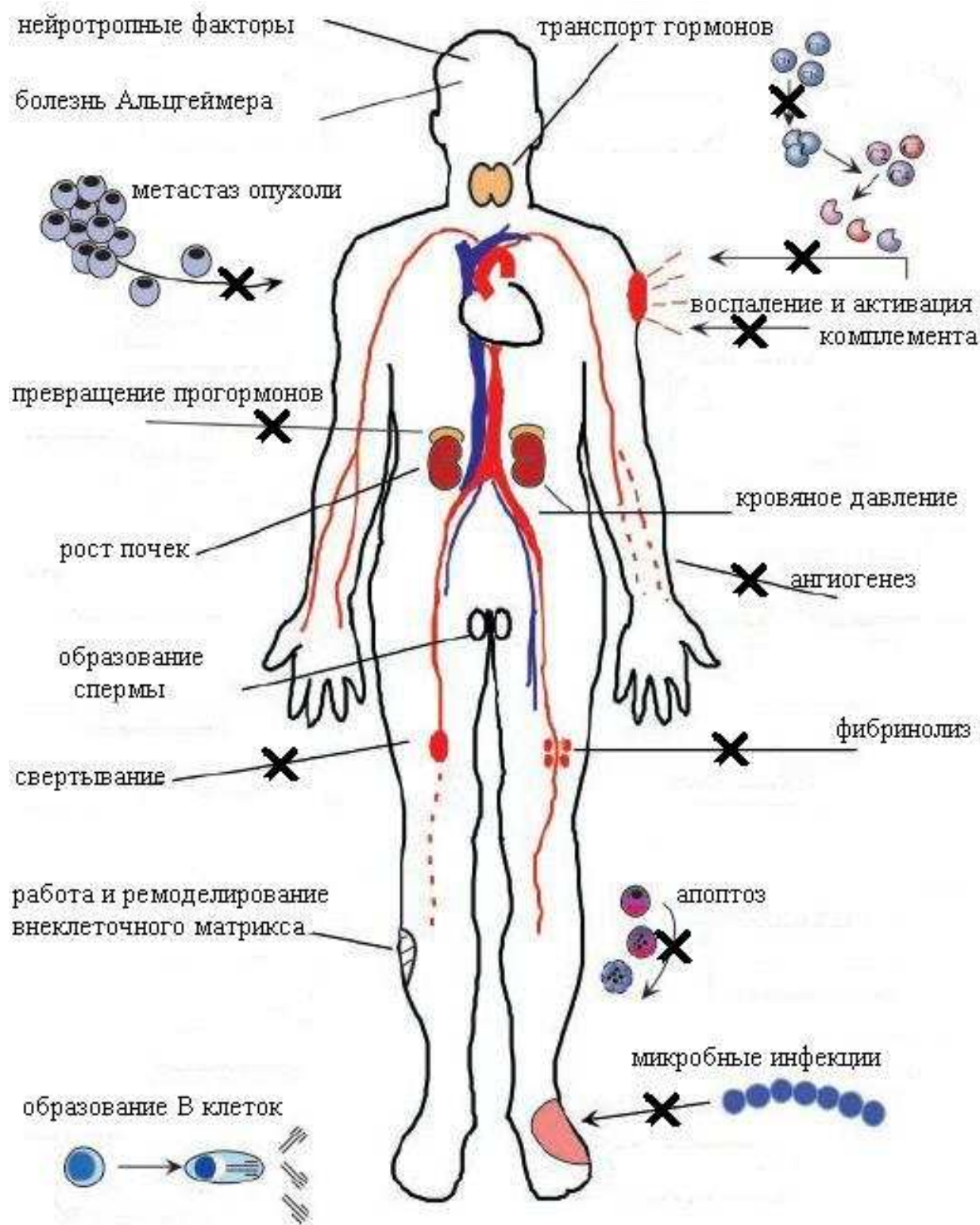


Рис. 7. Биологические функции серпинов человека (Silverman et al., 2001)

Крестиками обозначено прямое ингибирование серпинами протеаз, являющихся непосредственными участниками указанного процесса.

Биологические функции серпинов человека многообразны (рис. 7) и обусловлены не только непосредственным ингибированием протеолитических ферментов. Известно, что серпины участвуют в фундаментальных физиологических процессах, таких как свертывание крови, ангиогенез, апоптоз, активация комплемента, защищают клетки от внутреннего и внешнего протеолитического повреждения (Rubin, 1996; Richardson, Viswanathan, Lucas, 2006; Law et al., 2006). Большое количество работ посвящены изучению роли ингибиторов сериновых протеаз на иммунную систему (Lucas, McFadden, 2004; Bracho, 2005; Richardson, Viswanathan, Lucas, 2006; Wagenaar-Bos, Hack, 2006; Bas et al., 2007; Bernstein, 2008; Davis, Cai, Liu, 2007; Nepomniashchikh, Shchelkunov, 2008; Wouters et al., 2008; Zuraw, Christiansen, 2008). Функции многих ингибиторов сериновых протеаз изучены не до конца (Silverman et al., 2001). В последнее время активно исследуются иммуномодуляторные и гемостатические свойства серпинов (Lucas, McFadden, 2004; Rothman, 2005; Correale et al., 2008; Fareed et al., 2008a, 2008b; Moser et al., 2008; Nepomniashchikh, Shchelkunov, 2008; Warkentin, Greinacher, Koster, 2008).

Апротинин – поливалентный ингибитор протеаз

Апротинин – панкреатический ингибитор Кюнитца, один из наиболее широко изученных глобулярных белков семейства I2. Он был открыт независимо разными исследователями. В 1930 г. группа исследователей во главе с Краут (Kraut) выделили из бычьих легких инактиватор калликреина, а в 1936 г. Кюнитц и Нортроп (Kunitz, Northrop), выделив его из бычьей поджелудочной железы, описали как ингибитор трипсина. Идентичные ему ингибиторы выделены из околоушной железы крупного рогатого скота, а некоторые ткани (хрящ, аорта) содержат высокие концентрации ингибитора трипсина по многим параметрам сходные с апротинином (Веремеенко, Голобородько, 1986). Другие названия апротинина: панкреатический ингибитор

трипсина, поливалентный ингибитор протеиназ Кюнница-Норттропа, Antikrein, Antilysin(e), Kallikrein-trypsin inactivator, KirRichter, Kunitz protease inhibitor, **Basis Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI)**. Молекулярная формула $C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$, молекулярный вес 6514 атомных единиц массы. Активность апротинина выражают в калликреин инактивирующих единицах КИЕ (KIU – Kallikrein Inhibitor Unit). 1 КИЕ равна количеству апротинина, ингибирующему активность 2 биологических калликреиновых единиц на 50%. Для примера 1 мг апротинина эквивалентен 7143 КИЕ, или 5730 ТИЕ (1,33 КИЕ = 1 ТИЕ). Первичная структура апротинина представлена одноцепочечным полипептидом из 58 аминокислотных остатков (рис. 8, табл. 4).

Таблица 4

Аминокислотный состав соевого ингибитора трипсина (СИТ) и апротинина
(каталог Sigma, 2006)

Аминокислота		Апротинин	СИТ
Аланин	Ala	6	8
Аргинин	Arg	6	9
Аспарагин	Asn	3	9
Аспарагиновая	Asp	2	17
Валин	Val	1	14
Гистидин	His	-	2
Глицин	Gly	6	16
Глутамин	Gln	1	5
Глутаминовая	Glu	2	13
Изолейцин	Ile	2	14
Лейцин	Leu	2	15
Лизин	Lys	4	10
Метионин	Met	1	2
Пролин	Pro	4	10
Серин	Ser	1	11
Тирозин	Tyr	4	4
Треонин	Thr	3	7
Триптофан	Trp	-	2
Фенилаланин	Phe	4	9
Цистеин	Cys	6	4
ВСЕГО		58	181

На третичном уровне организации молекулы аprotинина образуются три дисульфидных связи: Cys5-Cys55, Cys14-Cys38, Cys30-Cys51 (рис. 8).

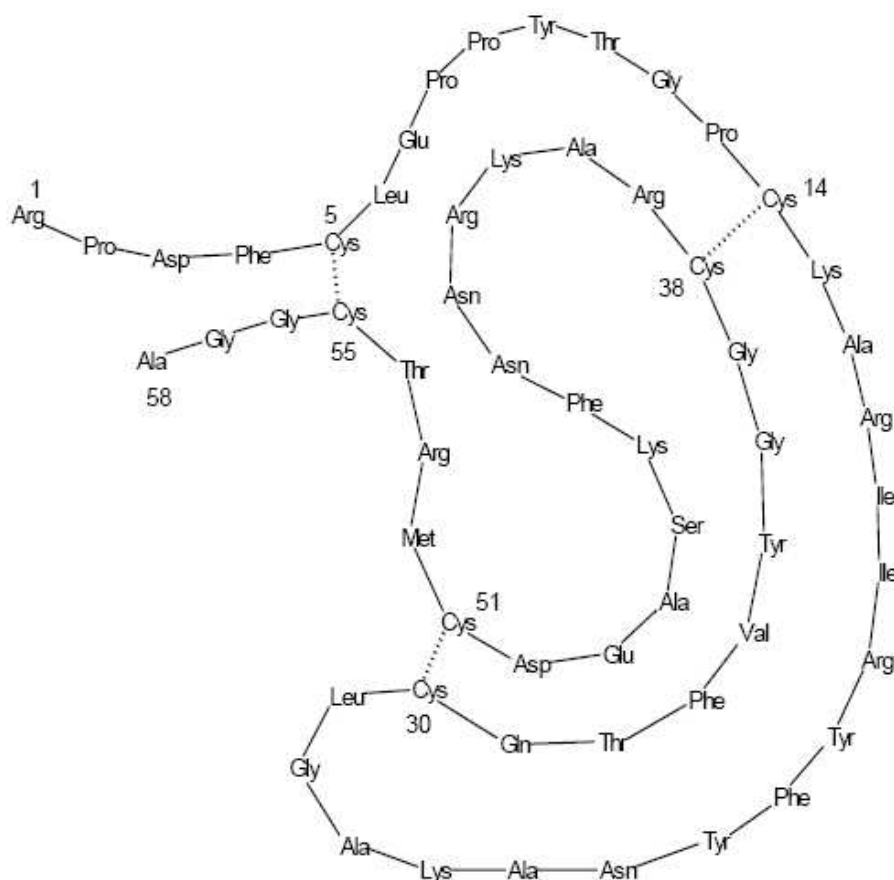


Рис. 8. Дисульфидные мостики в молекуле аprotинина (каталог Sigma, 2006)

1 – первый аминокислотный остаток цепи, 58 – последний аминокислотный остаток, между остатками Cys5-Cys55, Cys14-Cys38 и Cys30-Cys51 показаны дисульфидные мостики. Расшифровка аминокислот приведена в таблице 4.

В молекуле аprotинина один активный центр Lys15-Ala16 (см. рис. 8), реагирующий с сериновым сайтом ферментов. Связываясь с активным центром ферментов, аprotинин не гидролизует (Фершт, 1980). Комплексы аprotинин-протеаза очень стабильны, но могут диссоциировать при pH среды менее 3,2 или более 10 (каталог Sigma, 2006). В образовании комплексов кроме активного центра ингибитора принимают участие и его другие аминокислотные остатки, являющиеся подцентрами связывания.

Фрэй (Frey) впервые использовал апротинин в медицине в 1953 году (Дементьева и соавт., 1996). Наиболее широко апротинин используется в кардиохирургии (Чарная, Дементьева, 2005), хотя и имеет ряд серьезных недостатков (Бородин, Аксенова, Анищенко, 2000; Михайлов, 2002; Beierlein et al., 2005; Hanson et al., 2007; Zhong et al., 2007; Yang et al., 2008; Meta et al., 2009).

Соевый ингибитор трипсина

Ингибитор трипсина был обнаружен в 1938 г. в бобах сои *Glycine max* Боуманом (Bowman), и выделен из них Кюнитцом (Kunitz) в 1945 г. Принадлежит к белкам семейства I3. Синонимы: ингибитор трипсина типа Кюнитца, Soybean Basis Trypsin Inhibitor (**SBTI**), Soybean Trypsin Inhibitor (**STI**). На сегодняшний день известно, что в бобах сои содержится несколько полиморфных типов данного белка (Wang et al., 2008). Ингибитор трипсина Кюнитца из соевых бобов (далее СИТ) относится к белкам глобулярного типа. Молекулярный вес СИТ составляет около 20100 атомных единиц массы. Активность СИТ выражают в трипсин ингибиторных единицах (ТИЕ). 1 ТИЕ равна количеству ингибитора снижающего активность 2-х трипсиновых единиц на 50%.

Первичная структура ингибитора представлена одноцепочечным полипептидом из 181 аминокислотных остатков (см. табл. 4).

На уровне третичной организации в молекуле СИТ образуются две дисульфидные связи: Cys39-Cys86, Cys136-Cys145 (рис. 9). СИТ имеет один активный центр, состоящий из аргинина (положение в цепи 63) и изолейцина (положение в цепи 64), и располагающийся рядом центр связывания (см. рис. 9).

СИТ образует с протеазами обратимые и необратимые комплексы. Механизм действия СИТ до конца не ясен и продолжает исследоваться.

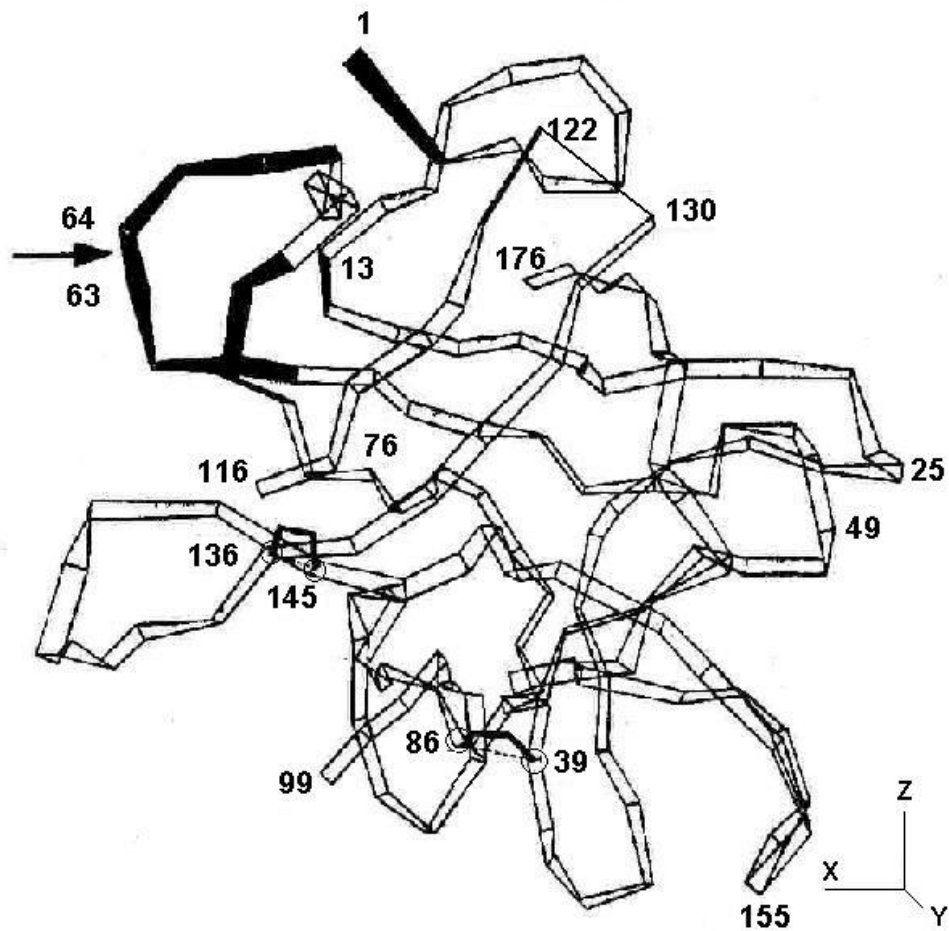


Рис. 9. Дисульфидные связи в молекуле СИТ (Blow, Janin, Sweet, 1974)

Перемычки между номерами 136 и 145, 39 и 86 обозначают дисульфидные связи. Активный центр (63 и 64) показан стрелкой. Черным показаны участки полипептидной цепи, являющиеся центром связывания с ферментами.

А.И. Арчаковым и соавторами (2005), установлено, что с повышением температуры константа скорости ассоциации комплекса трипсин-СИТ возрастает, а диссоциации – не изменяется. Сегодня СИТ выпускают как реагент для научных лабораторий, в которых активно исследуется влияние СИТ на организмы животных. Известно, что соевый ингибитор в условиях *in vitro* подавляет образование провоспалительных медиаторов, интерлейкинов в фибробластах, а также уменьшает летальность у мышей *in vivo* при введении эндотоксина липополисахаридной природы (Kobayashi et al., 2005a, 2005b, 2005c). СИТ в большом количестве содержится в соевых бобах, которые используются для изготовления различных продуктов питания. Среди диетических белков, соевый белок считается полноценным, так как содержит

все существенные аминокислоты (Velasquez, Bhathena, 2007). Продукты из сои применяют в диетотерапии (Mořa et al., 2007; Anderson, 2008; Kurzer, 2008; Rudkowska, 2008; Sakai, Kogiso, 2008; Xiao, 2008). Поэтому воздействие соевых продуктов на организм человека привлекает много внимания.

Уникальная природа ингибиторов протеолиза позволяет выполнять им разнообразные биологические функции, не связанные напрямую с подавлением активности ферментов. Тем не менее, основная роль ингибиторов заключается в ограничении деятельности протеолитических ферментов. Ингибиторы являются участниками основных физиологических процессов, сопряженных с протеолизом. Особое значение здесь принадлежит ингибиторам суперсемейства серпинов, которые, благодаря особому каталитическому типу действия, способны подавлять работу не только сериновых протеаз, но и ферментов других классов. В данное семейство ингибиторов включены белки, обнаруженные в различных формах жизни (вирусы, бактерии, растения, животные). На сегодняшний день активно изучаются серпины организма человека. Гомологичные им белки встречаются в организмах других млекопитающих и даже растениях. Несмотря на существенный прорыв в исследованиях ингибиторов белковой природы, позволившие открыть новые ингибиторы, а также новые функции уже известных ингибиторов, физиологическая роль многих из них до сих пор остается малоизученной.

Глава 3. Исследование высокомолекулярных соединений методами биоинформатики

Актуальными задачами биологии и химии является: исследование свойств химических веществ; исследование взаимодействия веществ, создание новых молекул с заданными свойствами, изучение влияния веществ на живой организм, в том числе человека. Подобные исследования являются долгими, трудоемкими и дорогими. Например, время исследования вещества с целью разработки возможного лекарства составляет около 5 лет, тогда как клинические испытания, при условии коммерческой доступности препарата, более 7 лет, и обходятся более чем в 700 млн долларов (Di Masi, Hansen, Grabowski, 2003; Ambesi-Impiombato, Bernardo, 2006; Pazos, Bang, 2006; Gao et al., 2008). В силу этого многие эксперименты являются недоступными для большинства исследователей. Одним из подходов к решению проблем, связанных с исследованием веществ, является применение компьютерных методов. В совокупности эти методы являются основой сравнительно молодой науки биоинформатики, относящейся к области вычислительной биологии.

Вычислительная биология не только ускоряет процесс изучения веществ, делая этот процесс экономически выгодным, но и представляет совершенно новый путь исследований (Ambesi-Impiombato, Bernardo, 2006). Методы биоинформатики представляют собой комплекс электронных баз данных низко- и высокомолекулярных веществ, вычислительных интернет-серверов и компьютерных программ по молекулярному моделированию, или, так называемому, компьютерному дизайну молекул, а исследование с помощью таких методов носит название *in silico*. Большое количество биоинформационных приложений (программ, серверов, баз), облегчающих изучение веществ, размещены в Интернете в свободном доступе (Villoutreix et al., 2007). В России научные исследования по компьютерному дизайну молекул объединены в направлении 04 «Компьютерное конструирование новых лекарственных средств».

В компьютерном исследовании веществ большое значение отводится интернет-серверам молекулярного моделирования и автономным компьютерным программам. На сегодняшний день имеется ряд серверов автоматизированного сравнительного моделирования, доступных для любого пользователя и одинаково понятных, как эксперту, так и новичку исследователю (Silveira et al., 2007). В частности с помощью интернет-серверов и компьютерных программ можно определить функции белка, исходя из его последовательности или структуры (Pazos, Bang, 2006).

Компьютерное моделирование предполагает использование уже готовых алгоритмов исследования, заложенных в сервера или компьютерные программы моделирования (Oliviero, 2006; Pazos, Bang, 2006). Для решения конкретной биологической задачи применяется определенный метод и конечный пользователь этих программ и интернет-серверов может выбрать необходимый (Pazos, Bang, 2006).

К методам биоинформатики выдвигаются определенные требования. Применительно к крупномасштабному сравнительному моделированию целых геномов конвейер моделирования должен быть автоматизирован, быстр, надежен, чувствителен, точен, и выполнять работу аналогично эксперту по конкретным белкам (Silveira et al., 2007). Исследование сходства между трехмерными белковыми структурами требует быстрых компьютеров, алгоритмов и компьютерных протоколов (Oliviero, 2006). Моделирование белковых структур требует проведения глубокой экспертизы в области биологии и использования компьютера, программируемого для каждого отдельного шага процесса моделирования. Работа с данными программами компьютерного дизайна требует знания определенной терминологии и языка структурированных запросов (например, SQL).

Компьютерные методы нашли широкое применение в фармакологических разработках и испытаниях, предсказании и открытии новых биологических целей веществ (Takeda-Shitaka et al., 2004; Blundell et al., 2006; Ekins, Mestres, Testa, 2007; Li, Lai, 2007). Примером результатов

использования биоинформатики является открытие новых противораковых препаратов (Geromichalos, 2007). Вычислительное моделирование рекомендуется внедрить как средство наблюдения за метаболическими изменениями организма (Hall, Baracos, 2008). В последнее время биоинформатика активно развивается, а ее методы уже позволяют исследовать не только простые и сложные вещества разного молекулярного уровня (гормоны, пептиды, ферменты), а также гены и целые геномы.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 4. Материалы и методы

Материалы

Объектами исследования были препараты апротинина («Контрикал», Германия) и СИТ («Reanal», Венгрия). Для сравнительной оценки функциональных свойств апротинина и соевого ингибитора трипсина использовали комплекс физиологических (определение протромбинового времени, активированного частичного тромбопластинового времени, тромбинового времени свертывания, продолжительности фибринолиза, степени и скорости агрегации тромбоцитов) и биохимических (определение трипсин-ингибиторной активности, протеолитической активности, гемолитической активности комплемента) методов. Проведено исследование влияния длительного приема изолята соевого белка на уровень протеолитической и трипсин-ингибиторной активности в сыворотке крови 28 добровольцев. Всего выполнено 684 пробы.

Схема исследования влияния приема соевого белка на протеолитическую и трипсин-ингибиторную активность крови и характеристика добровольцев

Данное исследование проводилось при участии врачей М.А. Штарберга и И.Г. Белоглазовой. Легитимность испытания на людях подтверждена Этическим комитетом ГОУ ВПО «Амурская государственная медицинская академия». Выписка из протокола заседания Этического комитета от 23 сентября 2007 г. прилагается. 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.

Реактивы

α -N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир	«Reanal» (Венгрия)
D-L-лизин солянокислый	квалификации «хч»
Адреналина гидрохлорид	«МЭЗ» (Россия)
Аденозин-5'-дифосфорная кислота динатриевая соль	«Reanal» (Венгрия)
Апротинин	«Контрикал» (Германия)
Ацетат натрия	квалификации «хч»
Кальция хлорид	квалификации «хч»
Кислота соляная	квалификации «хч»
кислота ε -аминокапроновая	квалификации «хч»
Коагуло-тест: эририд лиофильно-высушенный, суспензия каолина, кальция хлорид	«Ренам» (Россия)
Комплемент сухой	«Эколаб» (Россия)
Натрия хлорид	квалификации «хч»
Натрия цитрат	квалификации «хч»
Сыворотка гемолитическая диагностическая жидкая	«Эколаб» (Россия)

Техпластин-тест:	«Технология стандарт» (Россия)
тромбопластин-кальцевая смесь лиофильно-высушенная, плазма контрольная нормальная лиофильно-высушенная	
Трипсина ингибитор	«Reanal» (Венгрия)
Трипсин кристаллический	«SPOFA» (Чехия)
Трис (гидроксиметил-аминометан)	«Sigma» (США)
Тромбин-тест:	«Ренам» (Россия)
тромбин лиофильно-высушенный, этиленгликоль	
Фибринолиз-тест:	«Технология стандарт» (Россия)
суспензия каолина, кальция хлорид, Трис-HCl буфер, кислота уксусная	

Методы

Физиологические методы

Определение протромбинового времени свертывания плазмы крови (метод Квика)

Протромбиновое время определяли с помощью тест-наборов «Техпластин-тест» («Технология Стандарт», Россия) в соответствии с прилагающейся инструкцией. Готовили тромбопластин-кальцевую смесь: 0,1 мл тромбопластина, 0,1 мл 0,025 моль/л хлористого кальция. Готовую тромбопластин-кальцевую смесь (тромбопластин и Ca^{2+}) прогревали на водяной бане при 37°C в течение 30 секунд, далее к смеси добавляли 0,1 мл

контрольной плазмы или опытной плазмы и регистрировали время свертывания (образование сгустка) в секундах. 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 свертывания плазмы крови

Тромбиновое время определяли с помощью тест-наборов «Тромбин-тест» («Ренам», Россия). Принцип метода заключается в фиксировании времени образования сгустка фибрина из предшественника фибриногена под действием белка тромбина. Определение проводили в соответствии с инструкцией к тест-набору. Для контроля в пробирку вносили 0,2 мл контрольной плазмы, прогревали 1 мин при 37⁰С, затем добавляли 0,2 мл рабочего тромбина (нагретого до 25⁰С) и засекали время. Пробирку слегка встряхивали до образования фибрина и отмечали время свертывания. В исследуемых образцах тромбиновое время определяли аналогично контролю. Для изучения влияния трипсина и ингибиторов трипсина на тромбиновое время в опытных образцах плазму инкубировали с трипсином или ингибитором на водяной бане в течение 5 минут при 37⁰С, далее действовали аналогично контролю. Результаты выражали в секундах. Всего выполнено 48 проб.

Определение активированного частичного тромбопластинового времени свертывания плазмы крови

Активированное частичное тромбопластиновое время свертывания крови определяли с помощью тест-наборов «Коагуло-тест» («Ренам», Россия). Суть метода состоит в определении времени свертывания цитратной плазмы в условиях стандартизированной контактной каолиновой активации в

присутствие ионов кальция. Определение проводили по инструкции к тест-набору. Для контроля в пробирку последовательно вносили 0,1 мл контрольной плазмы, 0,1 мл рабочего раствора каолин-эрилидной смеси и прогревали 3 мин в водяной бане при 37⁰С. Затем вносили 0,1 мл раствора хлористого кальция (прогретого до 37⁰С), 0,2 мл тромбина (прогретого до 25⁰С) и засекали время. Слегка встряхивали пробирку и отмечали время свертывания в момент образования фибрина. В исследуемых образцах определяли активированное частичное тромбопластиновое время, аналогично контрольным образцам. Для изучения влияния ингибиторов трипсина на тромбиновое время в опытных образцах плазму с ингибиторами инкубировали на водяной бане в течение 5 минут при 37⁰С, далее аналогично контрольным образцам. Результаты выражали в секундах. Всего выполнено 48 проб.

Определение времени фибринолиза

Время фибринолиза определяли при помощи тест-наборов «Фибринолиз-тест» («Технология Стандарт», Россия) по инструкции к набору. Метод основан на оценке ускорения лизиса эуглобулинов, полученных из бедной тромбоцитами плазмы, обработанной каолином. В пробирке последовательно смешивали 0,5 мл плазмы, 7,5 мл дистиллированной воды, 0,25 мл рабочей 0,05% суспензии каолина и 0,18 мл 1,0% уксусной кислоты. Смесь инкубировали на водяной бане в течение 30 минут при 37⁰С, затем центрифугировали 5-6 минут при 250 g. Надосадочную жидкость сливали, а осадок помещали на фильтровальную бумагу и высушивали в течение одной минуты. Высушенный эуглобулиновый осадок растворяли в 0,5 мл рабочего раствора буфера. Плохо растворимые сгустки предварительно аккуратно измельчали пластиковым наконечником пипетки. К полученному раствору эуглобулинов добавляли 0,5 мл 0,277% раствора хлорида кальция, осторожно, не встряхивая, перемешивали и инкубировали на водяной бане при 37⁰С до

растворения сгустка. Время растворения сгустка регистрировали, а результаты выражали в минутах и секундах. 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 исследовали на анализаторе агрегации тромбоцитов AP 2110 («Солар», Беларусь), совмещенного с ПЭВМ, по методу указанному в инструкции к анализатору. В основе метода лежит непрерывное измерение изменений коэффициента светопропускания, происходящих в постоянно перемешиваемой и термостатируемой суспензии клеток. Метод позволяет наблюдать процесс агрегации на мониторе компьютера в виде графиков (агрегатограмм). За нулевое пропускание (0%) принимали светопропускание перекрытого кюветного отделения, за 100%-й уровень – светопропускание бестромбоцитной плазмы. В качестве индукторов агрегации брали растворы различных концентраций динатриевой соли аденидинуклеотиддифосфата (АДФ) и адреналина. В кювету вносили 0,45 мл стандартизированной плазмы. Кювету с контрольной или опытной плазмой ставили в термостатируемое кюветное отделение агрегометра (37⁰С) и добавляли 0,05 мл индуктора агрегации. Опытную плазму с трипсином или ингибиторами предварительно инкубировали в термостате в течение 5 минут при 37⁰С.

Для получения бестромбоцитную и богатую тромбоцитами плазму кровь брали утром натощак пункцией иглой локтевой вены, самотеком, в пластиковые пробирки объемом на 10 мл. В пробирки предварительно вносили по 1 мл 0,11 М раствора цитрата натрия. Для отделения богатой тромбоцитами плазмы свежую цитратную кровь (9 мл крови к 1 мл цитрата натрия) первый раз центрифугировали при низких оборотах (100 g) в течение 15 минут. Сразу

после центрифугирования богатую тромбоцитами плазму (супернатант) аккуратно забирали и помещали в другие пластиковые пробирки. Оставшуюся кровь (осадок) повторно центрифугировали на более высоких оборотах (2000 g) в течение 15 минут, затем отделившийся верхний бестромбоцитный слой плазмы сразу отбирали в пластиковые пробирки. Богатую тромбоцитами плазму использовали для исследования функциональной активности тромбоцитов, бестромбоцитную плазму – для калибровки шкалы оптической плотности анализатора агрегации и стандартизации плазмы (разведения богатой тромбоцитами плазмы до стандартного содержания клеток от $200 \cdot 10^9/\text{л}$ до $250 \cdot 10^9/\text{л}$). Анализ плазмы проводили не позднее 3-х часов после забора крови. О процессе агрегации судили по степени (процент светопропускания) и скорости (секунды) агрегации в целом, а также ее отдельных фаз. Всего выполнено 116 проб.

Биохимические методы

Определение трипсин-ингибиторной активности

Определение трипсин-ингибиторной активности исследуемых ингибиторов проводили по методу В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной (1977). Принцип метода заключается в измерении скорости гидролиза БАЭЭ трипсином путем регистрации изменений оптической плотности исследуемой пробы во времени. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-16 на длине волны 253 нм. Активность исследуемых образцов выражали в условных ингибиторных единицах (ИЕ), приходящихся на единицу массы или объема образца, которую рассчитывали по формуле:

$$ИЕ = \frac{(\Delta E_1 - \Delta E_2) 2,73n}{m}, \quad (1)$$

где ΔE_1 – прирост оптической плотности в пробе с трипсином (контроль) при 253нм за 1 мин, ΔE_2 – прирост оптической плотности с трипсином и ингибитором, 2,73 – коэффициент мольной экстинкции (при толщине кюветы 1 см), n – кратность разведения образца, m – количество мл образца.

Трипсин-ингибиторную активность определяли в сыворотке крови добровольцев (60 проб) и солянокислых растворах ингибиторов (80 проб) и растворах изолята соевого белка (60 проб).

Определение протеолитической активности

Определение общего уровня протеолитической активности в сыворотке крови (60 проб) проводили по методу В.Ф. Нартиковой и Т.С. Пасхиной (1977). Принцип метода заключается в измерении скорости гидролиза БАЭЭ протеазами крови путем регистрации изменений оптической плотности исследуемого раствора. Измерения проводили на спектрофотометре СФ-16 на длине волны 253 нм. Протеолитическую активность сыворотки крови рассчитывали по формуле и выражали в условных протеолитических единицах на мл (Е/мл):

$$E / \text{мл} = \frac{(\Delta ОП / \text{минуты}) 2,73}{m}, \quad (2)$$

где $\Delta ОП$ – разница между конечным и начальным значением оптической плотности пробы, 2,73 – коэффициент мольной экстинкции (при толщине кюветы 1 см), m – количество мл сыворотки.

Исследование гемолитической активности комплемента

Для исследования гемолитической активности комплемента в динамике *in vitro* нами был разработан способ реконструкции анализатора агрегации тромбоцитов SOLAR AP 2110, а также метод проведения эксперимента. Суть метода заключается в следующем. Эритроциты придают раствору опалесцирующий эффект с оттенком красного цвета. В процессе гемолиза эритроцитов гемоглобин выходит из разрушенных клеток, что сопровождается исчезновением эффекта опалесценции раствора («просветление» раствора). Принцип метода заключается в регистрации изменений светопропускания раствора в процессе гемолитического распада эритроцитов. Для измерений был использован анализатор агрегации тромбоцитов SOLAR AP 2110 с объемом рабочих кювет не более 1 мл. Общий объем раствора при нашем методе составляет 3,2 мл. Поэтому вместо круглых стандартных для анализатора агрегации тромбоцитов SOLAR AP 2110 кювет использовали одноразовые пластиковые кюветы квадратного сечения толщиной в 1 см и объемом на 4 мл. Измерения производили следующим образом. В «нулевую кювету» последовательно вносили 2,1 мл физиологического раствора, 0,1 мл рабочего раствора «Комплемента сухого» («Эколаб», Россия), 1 мл гемолитической системы (0,5% по содержанию эритроцитов) и перемешивали, после чего в кювете начинается гемолиз эритроцитов. Через 20 минут по данной пробе на анализаторе агрегации тромбоцитов SOLAR AP 2110 в режиме «AP» выставляли значение «ZERO» (значение «ZERO» в нашем случае соответствует 100%-му уровню светопропускания раствора, или полному гемолизу). Далее в «контрольную кювету» последовательно вносили 2,1 мл физиологического раствора, 0,1 мл рабочего раствора комплемента, 1 мл гемолитической системы, перемешивали и сразу проводили измерение на агрегометре, который уже настроен на значение «ZERO». Для этого помещали «контрольную кювету» в кюветное отделение вместо «нулевой кюветы» и нажимали кнопку «START». При этом прибор фиксировал значение светопропускания раствора в пределах

12-16%. Когда уровень светопропускания увеличивался на 1% (обычно не ранее 2-х минут) нажимали «START» повторно, после чего прибор принимал текущий уровень светопропускания (13-17%) за 0%, а дальнейшие изменения светопропускания отражал в динамике. В «опытную кювету» последовательно вносили 2 мл физиологического раствора, 0,1 мл рабочего раствора комплемента, 0,1 мл раствора исследуемого ингибитора и инкубировали в термостате в течение 5 минут при 36⁰С. Затем в кювету добавляли 1 мл гемолитической системы и снимали показания, как с «контрольной кюветы».

Получение эритроцитов и их сенсibilизацию проводили по методу Л.В. Козлова и соавторов (1982). Гемолитическую систему (соответствует 0,5% раствору по содержанию эритроцитов) использовали не позднее 3-х часов после приготовления. О влиянии апротинина, СИТ и трипсина на гемолитическую активность комплемента судили по скорости и степени гемолиза эритроцитов.

Данный метод исследования позволяет наблюдать и контролировать ход измерений гемолиза эритроцитов под действием комплемента в динамике. Результаты измерений представлены в виде графиков на мониторе компьютера и цифр на электронной панели анализатора, которые можно хранить в виде электронных файлов. Всего выполнено 116 проб.

Биоинформационные методы (*in silico*)

Для биоинформационного исследования апротинина и СИТ использовали: компьютерные программы Chem Office 5.0, ISIS Draw 2.4, Yasara 6.2.5, PASS Professional, Bio Edit 5.0.9; интернет-сервер BLAST; электронные базы данных белков (Protein Data Bank, Uni Prot и др.); персональный компьютер с выходом в Интернет.

Программа Chem Office 5.0 является комплексным приложением, разработанным в Кембридже для рисования, моделирования, анализа и визуализации химических соединений. Программа ISIS Draw 2.4 является

удобным химическим редактором, включающий простой химический анализ (например, вычисление молекулярных формул и веса, элементарного состава и др.). Программа Yasara 6.2.5 (Yet Another Scientific Artificial Reality Application) предназначена для разнообразной визуализации любых молекул с учетом химического строения. Программа PASS Professional (Prediction of Activity Spectra for Substances) разработана для прогнозирования спектра биологической активности, фармакологических эффектов, механизмов действия, мутагенности, канцерогенности, тератогенности и эмбриотоксичности веществ на основе структурной формулы. Средняя точность прогноза составляет свыше 85%. Программа Bio Edit 5.0.9 разработана для создания и редактирования в электронном виде биологических аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, а также их множественного выравнивания (определения гомологии) и анализа. Определение степени гомологии в программе Bio Edit 5.0.9, основано на множественном попарном выравнивании последовательностей с подстановкой матрицы оценки гомологии – PAM250 matrix. Интернет-сервер BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) – это доступный для любого пользователя Интернета инструмент, предназначенный для сравнения, определения гомологии и поиска гомологов аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, основанный на одноименном алгоритме BLAST. Сервер BLAST является интернет-аналогом программы Bio Edit 5.0.9. С программами и сервером работали согласно прилагаемым инструкциям.

Спектр возможных биологических активностей аprotинина и СИТ определяли при помощи программ ISIS Draw 2.4 и PASS Professional.

Для построения и визуализации электронных пространственных структур аprotинина и СИТ мы использовали программы Chem Office 5.0 и Yasara 6.2.5.

Для работы с программами необходимо использовать файлы формата FASTA, в которых необходимо зашифровывать аминокислотную последовательность согласно следующим правилам:

A alanine

P proline

B aspartate or asparagine

Q glutamine

C cystine	R arginine
D aspartate	S serine
E glutamate	T threonine
F phenylalanine	U selenocysteine
G glycine	V valine
H histidine	W tryptophan
I isoleucine	Y tyrosine
K lysine	Z glutamate or glutamine
L leucine	X any
M methionine	* translation stop
N asparagine	- gap of indeterminate length

Также использовались форматы MOL и PDB, который в отличие от формата FAS является не просто текстовым файлом, а содержит информацию о химической структуре и его можно преобразовывать в другие форматы.

Статистические методы

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ статистической обработки данных «StatPlus 2007 Professional Сборка 4.3.0.0» и «StatSoft Statistica v6.0». Различия между группами устанавливались по t-критерию Стьюдента.

Глава 5. Исследование апротинина и соевого ингибитора трипсина методами биоинформатики (*in silico*)

Нами была предпринята попытка применить современные методы биоинформатики на начальном этапе данного исследования ингибиторов протеолитических ферментов, в частности, выявить структурную и функциональную однотипность апротинина и СИТ. Для достижения этой задачи было запланировано выполнить следующее:

- 1) в Интернете провести обзор электронных баз данных белков, специальных компьютерных программ и серверов вычислительной биологии;
- 2) определить степень гомологии полипептидных цепей апротинина и СИТ *in silico*;
- 3) выявить и сопоставить спектры биологической активности апротинина и СИТ *in silico*;
- 4) построить электронные трехмерные третичные структуры апротинина и СИТ и провести поиск молекул-мишеней для данных ингибиторов *in silico*.

5.1. Обзор электронных компьютерных программ, баз данных и серверов

В глобальной компьютерной сети, Интернете, нами было найдено более 100 международных в основном англоязычных электронных баз данных, хранящих информацию о различных по химической природе веществах. Веществам пептидной природы посвящены около 50 электронных баз данных:

- 1) AARSDB – **A**mino**A**cyl-tRNA Synthetases **D**ata **B**ase;
- 2) ASTRAL – The ASTRAL compendium for Sequence and Structure Analysis;
- 3) BioImage – **B**iological **I**mages for scientific research;

- 4) BioMagResBank [BMRB] – repository for data from NMR on proteins, peptides, and nucleic acids;
- 5) Blocks – most highly conserved regions of proteins;
- 6) BRENDA – Enzyme Database;
- 7) CE – Databases and Tools for 3-D Protein Structure Comparison and Alignment;
- 8) CluSTr – a database of **clusters** of SWISS-PROT/**Tr**EMBL proteins;
- 9) COG – the database of **C**lusters of **O**rtologous **G**roups of proteins;
- 10) DaliDD – **D**ali **D**omain **D**ictionary;
- 11) DIP – **D**atabase of **I**nteracting **P**roteins;
- 12) DOMO – protein domain database;
- 13) DSSP – **D**ictionary of **S**econdary **S**tructure of **P**roteins;
- 14) ENZYME – **ENZYME** nomenclature database;
- 15) FSSP – **F**old classification based on **S**tructure-**S**tructure alignment of **P**roteins;
- 16) GTOP – **G**enomes **T**O **P**rotein structures and functions;
- 17) Histones – **Histone** sequence database;
- 18) HSSP – **H**omology-derived **S**econdary **S**tructure of **P**roteins;
- 19) HUGE – **H**uman **U**nidentified **G**ene-**E**ncoded large protein database;
- 20) iProClass – an **i**ntegrated, **c**omprehensive and **a**nnnotated **P**rotein **C**lassification database;
- 21) ISSD – **I**ntegrated **S**equence-**S**tructure **D**atabase;
- 22) Kabat – **Kabat** database of sequences of proteins of immunological interest;
- 23) Klotho – biochemical compounds declarative database;
- 24) LGIC – **L**igand **G**ated **I**on **C**hannel subunit database;
- 25) LIGAND – **LIGAND** chemical database for enzyme reactions;
- 26) MEROPS – Peptidase database;
- 27) MetaFam – comprehensive protein family resource;
- 28) MMDB – **M**olecular **M**odelling **D**ata**B**ase;
- 29) MSD – **M**acromolecular **S**tructure **D**atabase;

- 30) OWL – Composite Protein Sequence Database;
- 31) PALI – database of **Phy**logeny and **AL**ignment of homologous protein structures;
- 32) PDB – Brookhaven **P**rotein **D**ata**B**ank;
- 33) PFAM – **P**rotein **f**amilies database of alignments and HMMs;
- 34) PIR – **P**rotein **I**nformation **R**esource;
- 35) PIR-ALN – database of **P**rotein sequence **AL**lig**N**ments;
- 36) PMD – **P**rotein **M**utant **D**atabase;
- 37) Predictome – database of putative functional links between proteins;
- 38) PRINTS – database of protein family finger**PRINTS**;
- 39) ProDom – **P**rotein **D**omain families database;
- 40) PROSITE – **PRO**tein **SITE**s and patterns dictionary;
- 41) Rebase – **R**estriction **E**nzyme data**BASE**;
- 42) SBASE – protein domain library;
- 43) SCOP – **S**tructural **C**lassification **O**f **P**roteins;
- 44) SWISS-PROT – the protein sequence data bank;
- 45) TIGRFAMs – a protein family resource for the functional identification of proteins;
- 46) trEMBL – **EMBL** protein-coding DNA sequence features **t**ranslated into peptide sequences.

В данных электронных базах встречается информация следующего рода: идентификационный номер молекулы, привязанный к конкретной базе; описание молекул, их предшественников, первичной последовательности, структурных уровней, реакционного центра, молекул-мишеней, механизма действия, биологической активности, белков-гомологов; классификация белков; таксономические сведения (кланы, подкланы, семейства, подсемейства), ссылки на литературу. Вся информация представлена в виде электронных файлов: текстового, графического и других специальных форматов (рис. 10).

a)

arg- pro- asp- phe- cys- leu- glu- pro- pro- tyr- thr- gly- pro- cys- lys- ala- arg- ile- ile- arg-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 tyr- phe- tyr- asn- ala- lys- ala- gly- leu- cys- gln- thr- phe- val- tyr- gly- gly- cys- arg- ala-
 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
 lys- arg- asn- asn- phe- lys- ser- ala- glu- asp- cys- met- arg- thr- cys- gly- gly- ala-
 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58

б)

asp- phe- val- leu- asp- asn- glu- gly- asn- pro- leu- glu- asn- gly- gly- thr- tyr- tyr- ile- leu-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 ser- asp- ile- thr- ala- phe- gly- gly- ile- arg- ala- ala- pro- thr- gly- asn- glu- arg- cys- pro-
 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
 leu- thr- val- val- gln- ser- arg- asn- glu- leu- asp- lys- gly- ile- gly- thr- ile- ile- ser- ser-
 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
 pro- tyr- arg- ile- arg- phe- ile- ala- glu- gly- his- pro- leu- ser- leu- lys- phe- asp- ser- phe-
 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 ala- val- ile- met- leu- cys- val- gly- ile- pro- thr- glu- trp- ser- val- val- glu- asp- leu- pro-
 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
 glu- gly- pro- ala- val- lys- ile- gly- glu- asn- lys- asp- ala- met- asp- gly- trp- phe- arg- leu-
 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120
 glu- arg- val- ser- asp- asp- glu- phe- asn- asn- tyr- lys- leu- val- phe- cys- pro- gln- gln- ala-
 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140
 glu- asp- asp- lys- cys- gly- asp- ile- gly- ile- ser- ile- asp- his- asp- asp- gly- thr- arg- arg-
 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160
 leu- val- val- ser- lys- asn- lys- pro- leu- val- val- gln- phe- gln- lys- leu- asp- lys- glu- ser- leu-
 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177-178 179 180 181

Рис. 10. Первичные последовательности белков, представленные в виде текста на примере аprotинина (а) (база данных белков UniProt) и СИТ (б) (база данных белков Protein Data Bank)

Одинаковыми оттенками серого цвета выделены пары аминокислот, между которыми образуются дисульфидные мостики (5 и 55, 14 и 38, 30 и 51 для аprotинина, 39 и 86, 136 и 145 для СИТ). Активные центры ингибиторов обведены черной линией (аминокислоты 15-16 для аprotинина и 63-64 для СИТ). Расшифровка аминокислотных остатков приведена в таблице 4.

Среди просмотренных баз данных белков только 9 содержат данные об исследуемых ингибиторах (табл. 5).

Поиск специальных компьютерных программ и серверов вычислительной биологии показал, что в этой области существует довольно большой ряд

различных по возможностям современных компьютерных программных продуктов.

Таблица 5

Электронные базы данных белковых последовательностей, содержащие информацию об апротинине и соевом ингибиторе трипсина (СИТ)

Название и электронный адрес базы данных	Идентификационный код в базе данных	
	Апротинин	СИТ
UniProt-Swiss-Prot http://www.expasy.org/sprot/	BPT1_BOVIN (P00974)	ITRA_SOYBN (P01070)
Blocks - most highly conserved regions of proteins http://www.ebi.ac.uk/interpro/	P00974	IPR002160
COG - the database of Clusters of Orthologous Groups of proteins http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Precursor P00974; NP_001001554;	-
GTOP - Genomes TO Protein structures and functions http://spock.genes.nig.ac.jp/~genome/gtop.html	btau0:ENSBTAG000000 17328	?atha0:At1g17860 .1
iProClass - an integrated, comprehensive and annotated Protein Classification database http://pir.georgetown.edu/iproclass/	P00974/BPT1_BOVIN; PIRSF001621(это PIRSF ID)	-
LIGAND - LIGAND chemical database for enzyme reactions http://www.pasteur.fr/units/neubiomol/LGIC.html	50059016; 3809839; bta:616039; 100156830; Bt.32343;BPT1_BOVIN	-
MMDB - Molecular Modeling Data Base http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB/mmdb.shtml	P00974 (Precursor); 1QLQ	1AVU
PDB - Protein Data Bank http://www.rcsb.org/pdb/	1OA6	1AVU; 1BA7
MEROPS (database peptidases) http://merops.sanger.ac.uk/	I02.001	I03.001

Проанализировав информацию, полученную в Интернете, мы отобрали для решения поставленной нами задачи две наиболее информативные базы

Protein Data Bank и UniProt/Swiss-Prot, программы Chem Office 5.0, ISIS Draw 2.4, Yasara 6.2.5, PASS Professional и Bio Edit 5.0.9, а также интернет-сервер BLAST, находящиеся в свободном доступе.

5.2. Определение степени гомологии аминокислотных последовательностей ингибиторов

Для определения степени гомологии апротинина и СИТ, методом выравнивания, в Bio Edit 5.0.9 и интернет-сервер BLAST мы вводили аминокислотные последовательности исследуемых ингибиторов в формате FASTA:

>Aprotinin (Апротинин)

RPDFCLEPPYTGPCKARMIKYFYNI RSRSC EEFIYGGCEAKKNNFEAME
DCMRTCGGA

>Soybean Trypsin Inhibitor (СИТ)

DFVLDNEGNPLENGGTYI LSDITAFGGIRAAPTGNERCPLTVVQSRNE
LDKGIGTIISPYRIRFIAEGHPLSLKFDSFAVIMLCVGIPTEWSVVEDLP
EGPAVKIGENKDAMDGWFR LERVSDDEFNNYKLVFCPQQAEDDKCG
DIGISIDHDDGTRRLVVS KNKPLVVQFQKLDKESL

Определение степени гомологии через интернет-сервер BLAST показало, что исследуемые ингибиторы не являются сходными. Однако через программу Bio Edit получены противоположные данные. Результаты выравнивания апротинина и СИТ с помощью программы Bio Edit 5.0.9 представлены на рисунках 11 и 12.

Программа показала, что полипептидные цепи данных ингибиторов гомологичны на 10%.

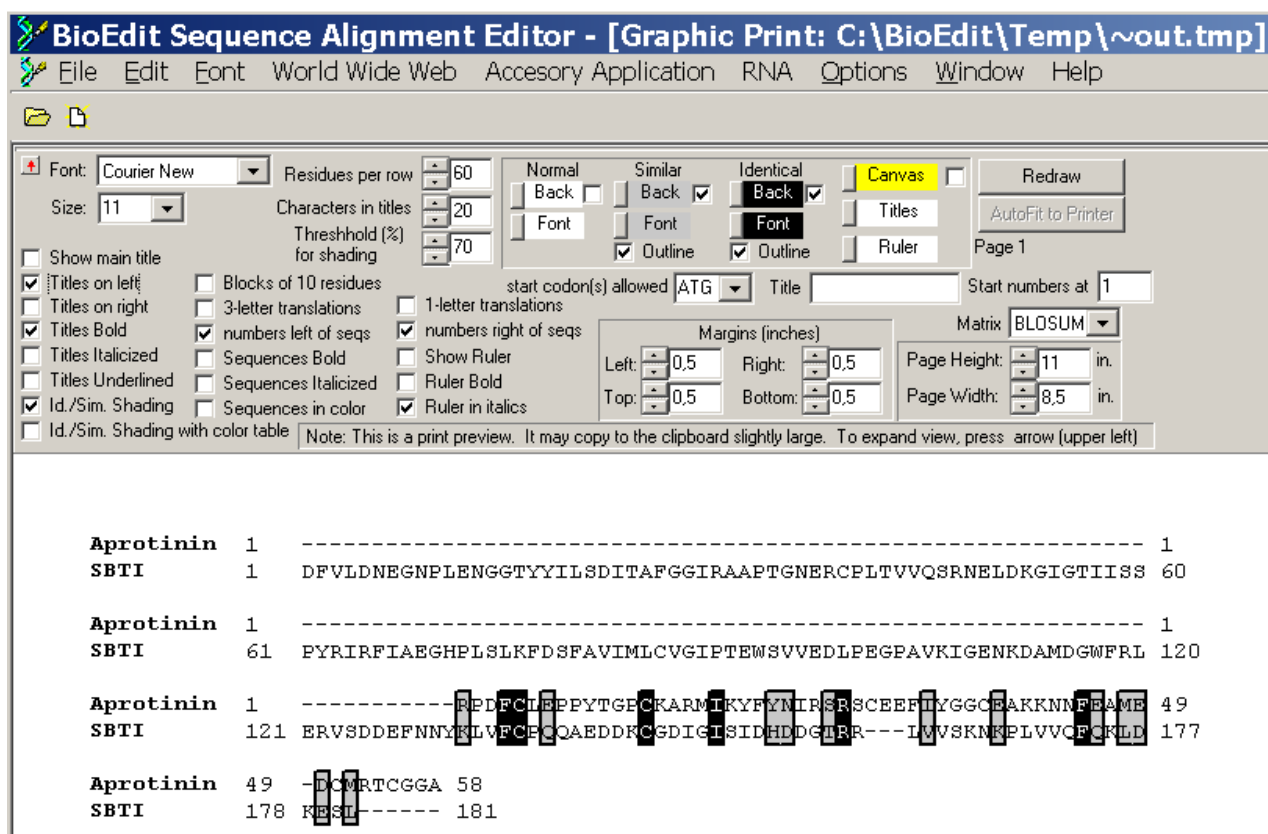


Рис. 11. Рабочее окно программы Bio Edit 5.0.9 с результатом подсчета гомологии апротинина (Aprotinin) и соевого ингибитора трипсина (SBTI)

Черным цветом обведены идентичные аминокислоты, серым – химически подобные.

Следующим шагом мы провели сравнение отдельных аминокислотных областей молекул апротинина с СИТ, которое показало более высокий уровень ГОМОЛОГИИ.

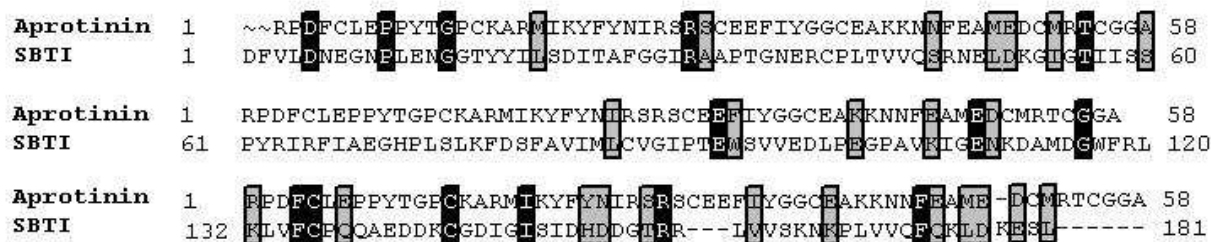


Рис. 12. Рабочее окно программы Bio Edit 5.0.9 с результатом определения гомологичных областей полипептидных цепей апротинина (Aprotinin) и соевого ингибитора трипсина (SBTI)

Черным цветом обведены идентичные аминокислоты, серым – химически подобные.

Гомология N-концевой области СИТ (участок цепи 5-60) и апротинина без 2-х крайних N-концевых аминокислот составила 21%. Центральная область СИТ (участок цепи 85-116) и участок цепи апротинина 25-56 схожи на 24%. Наиболее гомологичными аминокислотными областями (35%, сходство обнаружено по 16 парам аминокислотных остатков) оказались С-концевая область СИТ (участок цепи 132-181) и цепи апротинина без 6 последних С-концевых аминокислотных остатков (см. рис. 12).

5.3. Определение спектров биологической активности ингибиторов

Первым шагом в выявлении биологической активности ингибиторов было создание в программе ISIS Draw 2.4 файлов формата MOL, содержащих информацию о структурных формулах полипептидных цепей апротинина и СИТ. На рисунке 13 представлен пример молекулы апротинина на уровне первичной организации белка.

Спектр биологической активности исследуемых ингибиторов был определен программой PASS, в которую загружали их структурные формулы в формате MOL. Из 100 возможных биологических активностей программой было выявлено 4 предполагаемых видов активности для апротинина и 3 для СИТ. Результаты определения вероятных биологических эффектов данных ингибиторов представлены на рисунке 14.

По трем видам активности ингибиторы оказались схожи. Так, они являются ингибиторами ренина, ангиотензин-превращающего и эндотелин-превращающего ферментов, а возможность проявления перечисленных эффектов (drug-likeness) одинакова у обеих молекул (см. рис 14).

Согласно программе апротинин также является ингибитором нейтральной эндопептидазы. Для всех определенных видов активности критерий P_a (вероятность наличия активности) оказался значительно выше критерия P_i

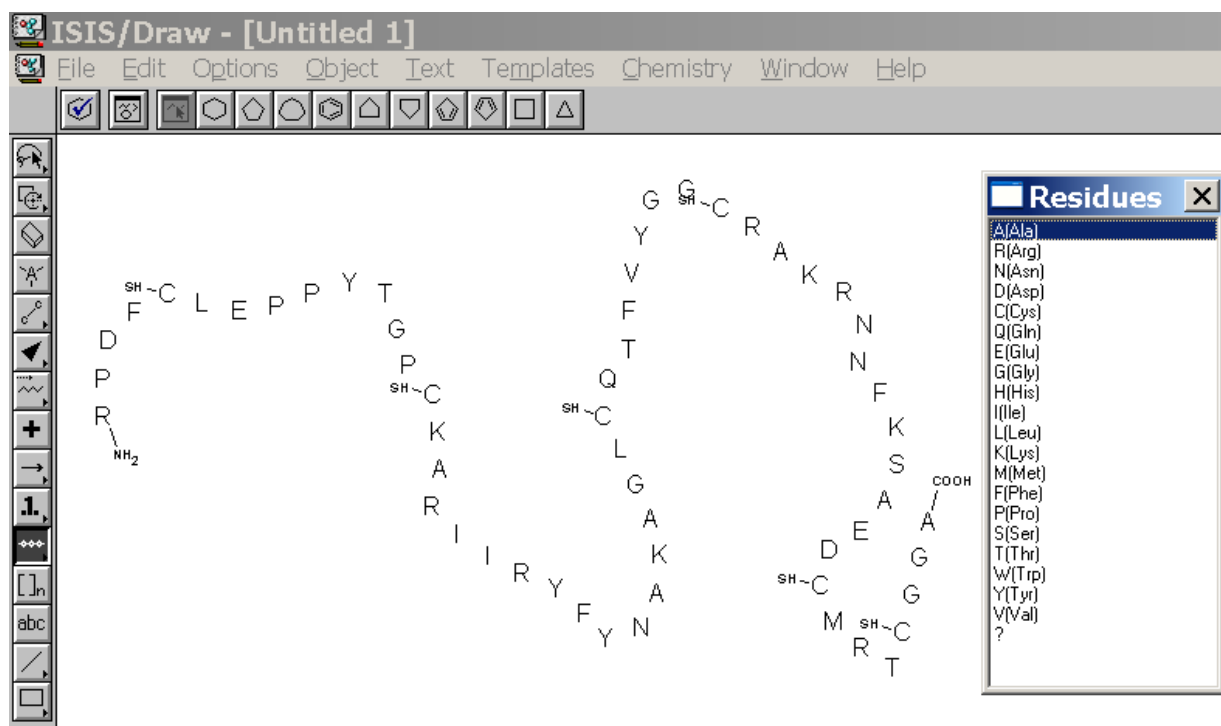


Рис. 13. Рабочее окно программы ISIS Draw 2.4 с изображением первичной структуры полипептидной цепи аprotинина

В окне «Residues» приведена таблица соответствия одно- и трехбуквенных обозначений аминокислотных остатков.

Рис. 14. Рабочее окно программы PASS с результатами определения спектра биологической активности аprotинина и СИТ:

«Drug-Likeness» – вероятность проявления эффекта; P_a – вероятность наличия вида активности; P_i – вероятность отсутствия вида активности.

(вероятность отсутствия активности), что указывает на высокий уровень вероятности проявления указанных биологических эффектов. Кроме того, программа показала, что исследуемые ингибиторы не обладают токсичностью, мутагенностью, канцерогенностью и тератогенностью.

5.4. Построение электронных трехмерных третичных структур ингибиторов

Результаты построения электронных трехмерных структур исследуемых ингибиторов отображены на рисунках 15, 16 и 17.

Для построения трехмерных электронных структур в программу Chem Office 5.0 мы вводили файлы формата MOL и конвертировали в формат PDB. Полученные нами, а также взятые из электронных баз данных белков, PDB файлы вводили в программы Chem Office 5.0 и Yasara 6.2.5.

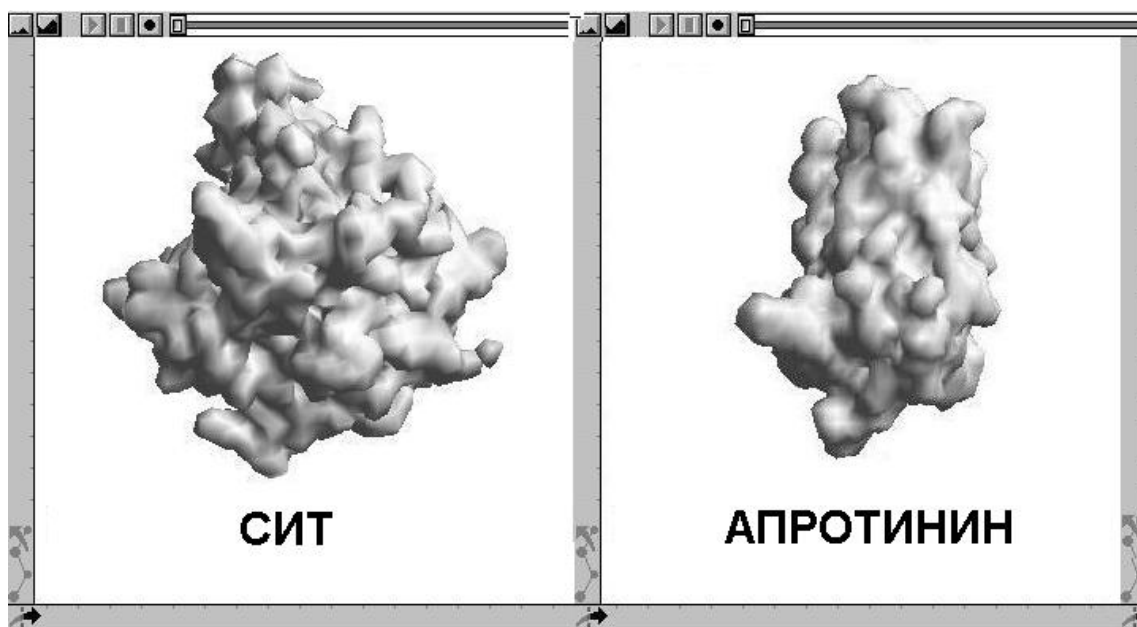


Рис. 15. Электронные трехмерные модели третичных структур аprotинина и СИТ в виде твердых тел с единой поверхностью (построены в программе Chem Office 5.0)

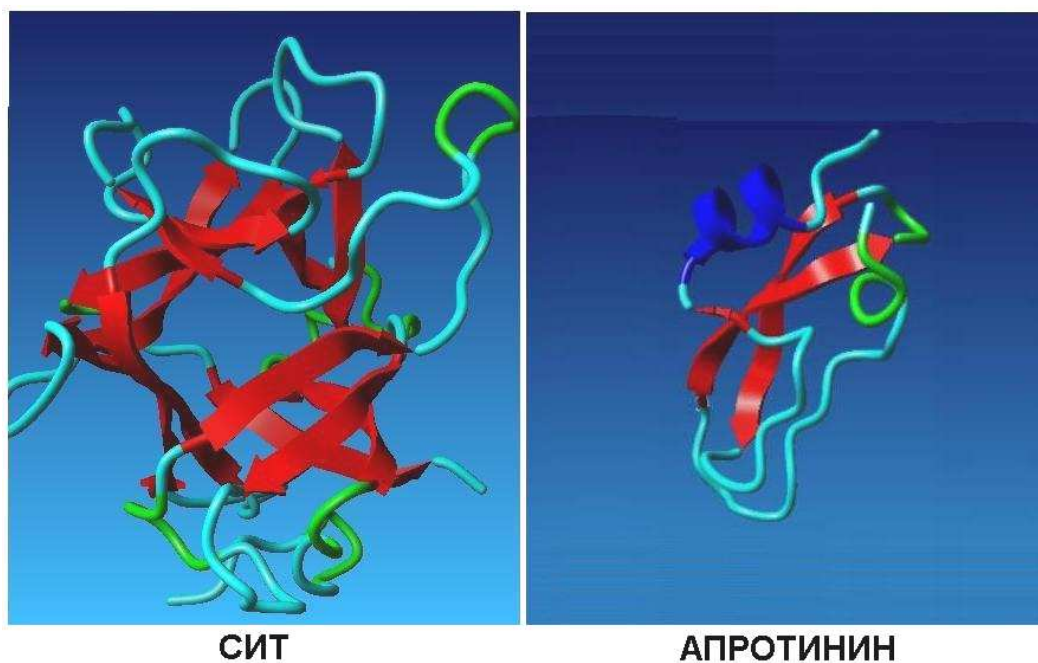


Рис. 16. Электронные трехмерные модели третичных структур аprotинина и СИТ в виде трубок и лент, показывающих тип спирализации участков полипептидной цепи (построены в программе Yasara 6.2.5)

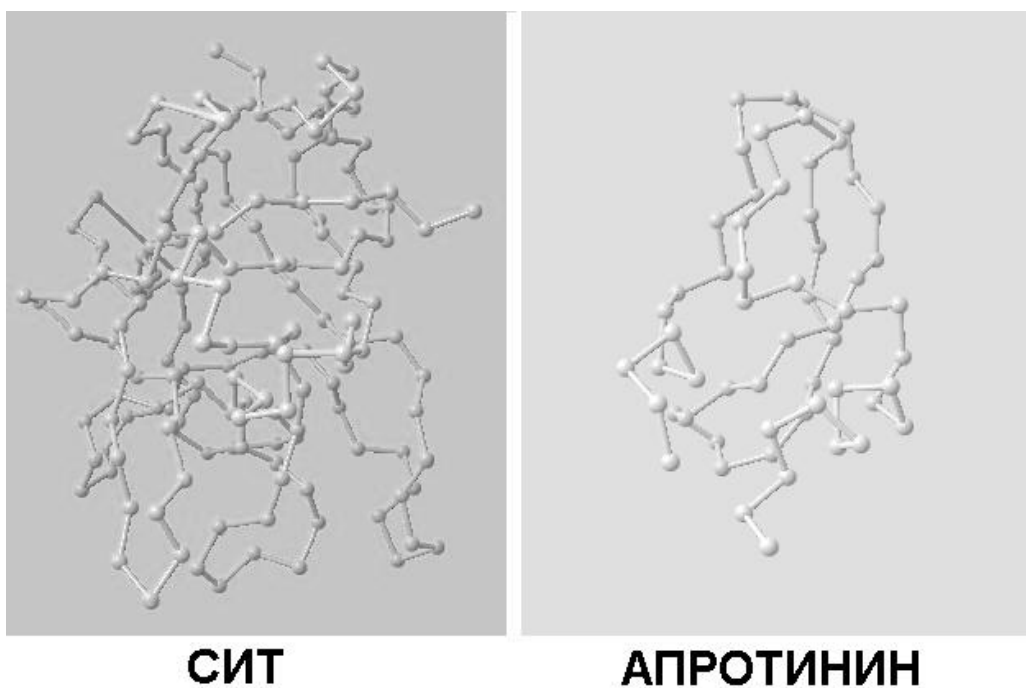


Рис. 17. Электронные трехмерные шаростержневые модели третичных структур аprotинина и СИТ (построены в программе Yasara 6.2.5)

Шариками обозначены аминокислотные остатки.

Глава 6. Определение трипсин-ингибиторной активности апротинина и соевого ингибитора трипсина *in vitro*

В задачи нашей работы входило определить удельную ингибиторную активность СИТ и апротинина по отношению к трипсину. Также для сравнения была определена трипсин-ингибиторная активность синтетических низкомолекулярных ингибиторов протеаз: ϵ -аминокапроновой кислоты и D-лизина. Результаты представлены на рисунках 18 и 19.

ИЕ

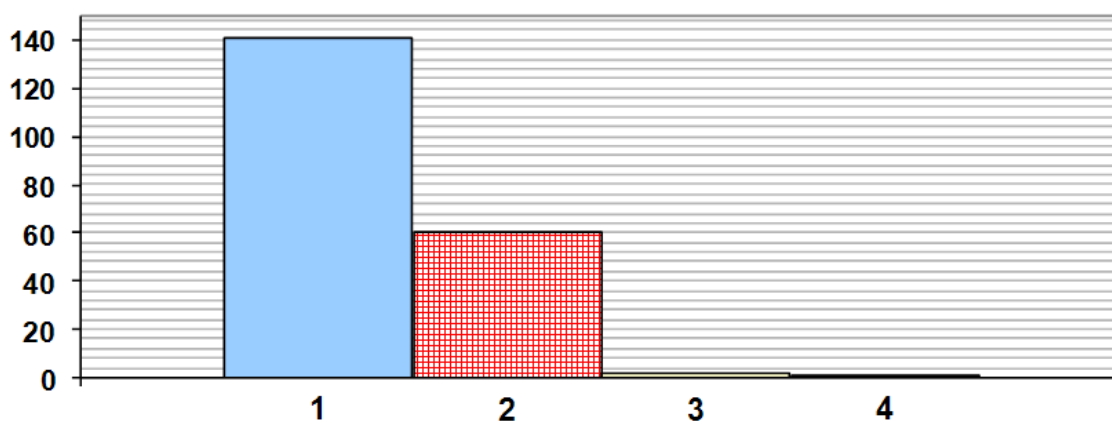


Рис. 18. Удельная трипсин-ингибиторная активность апротинина (1), СИТ (2), ϵ -аминокапроновой кислоты (3) и D-лизина (4)

Активность указана в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 мг вещества.

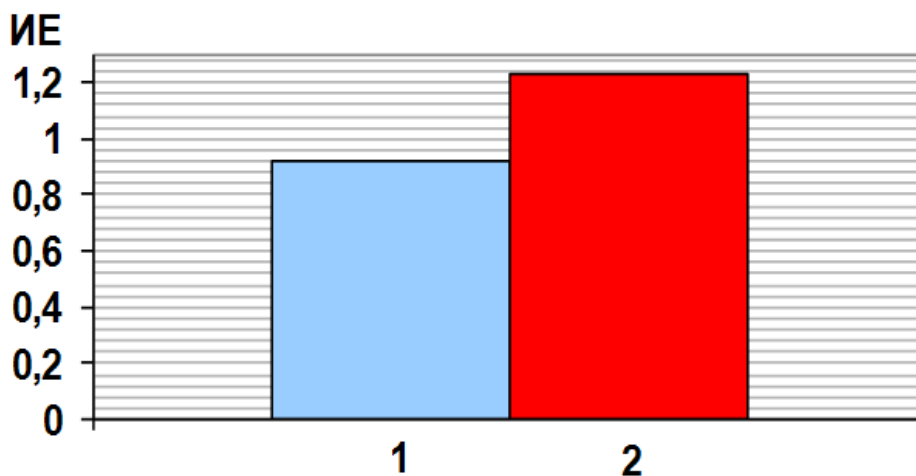


Рис. 19. Трипсин-ингибиторная активность апротинина (1) и СИТ (2) в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 нмоль вещества

При расчете трипсин-ингибиторной активности на единицу массы ингибитора она снижается в 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).

Глава 7. Исследование влияния апротинина и соевого ингибитора трипсина на протеолитические системы крови *in vitro*

Поскольку апротинин и СИТ ингибируют действие сериновых энзимов – ключевых ферментов протеазно-ингибиторных систем, предварительно мы решили выяснить возможные точки приложения данных ингибиторов в протеолитических системах крови. С этой целью была составлена общая упрощенная схема, в которой подчеркивается роль сериновых протеаз в функционировании и взаимосвязи отдельных протеолитических систем крови (рис. 20). Краткое описание ключевых сериновых пептидогидролаз основных физиологических процессов организма человека, сопряженных с работой протеолитических ферментов, представлено в таблице 6.

Из представленных в таблице 6 и на рисунке 20 протеолитических систем видно, что в системы гемостаза и комплемента входит наибольшее количество сериновых протеаз и их предшественников (факторы III, XII, XI, X, IX, VII, II, прекалликреин и другие). Это послужило основным критерием при выборе протеазно-ингибиторных систем как объектов исследования бычьего панкреатического ингибитора протеаз и ингибитора и соевых бобов. В частности объектами, затрагивающих плазменный и сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, были процессы свертывающей и противосвертывающей систем, а также агрегация тромбоцитов.

В ходе проведенного эксперимента был поставлен ряд опытов, позволяющих охарактеризовать показатели свертывания крови (протромбиновое время, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время), противосвертывающей системы (длительность фибринолиза), агрегации тромбоцитов (скорость и степень агрегации), комплемент-опосредованного гемолиза эритроцитов (скорость и степень гемолизиса эритроцитов).

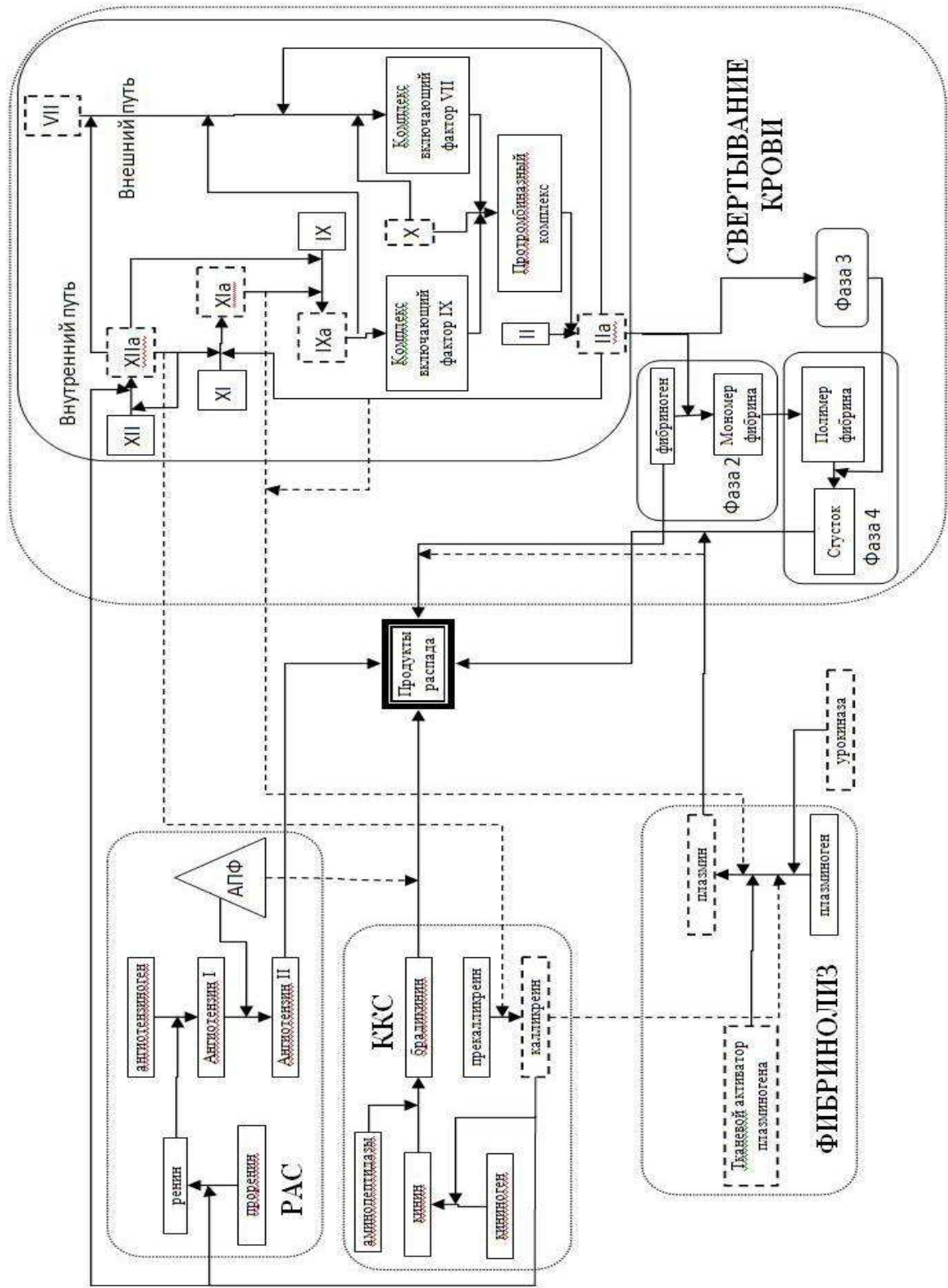


Рис. 20. Взаимосвязь протеолитических систем организма через сериновые протеазы
 А ПФ – ангиотензин-превращающий фермент, ККС – калликреин-кининовая система, РАС – ренин-ангиотензиновая система.
 Сериновые протеазы обведены пунктирными рамками. Стрелками показано каталитическое действие ферментов.

Сериновые протеазы некоторых протеолитических систем организма

Английское название фермента	Русское название фермента	Синонимы	Номенклатурный номер и код семейства	Протеолитическая система
Thrombin	Тромбин	Fibrinogenase, 2-й фактор свертывания	3.4.21.5 family S1	Свертывание крови, агрегация тромбоцитов
Coagulation factor VIIa	7-ой фактор свертывания	Проконвертин	3.4.21.21 family S1	Свертывание крови
Coagulation factor Xa	10-й фактор свертывания	Prothrombinase, Stuart factor, Thrombokinase	3.4.21.6 family S1	Свертывание крови
Coagulation factor XIIa	12-й фактор свертывания	Hageman factor	3.4.21.38 family S1	Свертывание крови, фибринолиз
Coagulation factor XIa	11-й фактор свертывания	Plasma thromboplastin antecedent	3.4.21.27 family S1	Свертывание крови
Coagulation factor IXa	9-й фактор свертывания	Christmas factor	3.4.21.22 family S1	Свертывание крови
Plasmin	Плазмин	Fibrinase, Fibrinolysin	3.4.21.7 family S1	Фибринолиз
T-plasminogen activator	Тканевый активатор плазминогена	Tissue plasminogen activator, tPA, 3-й фактор свертывания	3.4.21.68 family S1	Свертывание крови, фибринолиз
U-plasminogen activator	Урокиназа	Cellular plasminogen activator, Urinary plasminogen activator	3.4.21.73 family S1	Фибринолиз
Plasma kallikrein	Калликреин плазмы	Kininogenin, Serum kallikrein	3.4.21.34 family S1	Калликреин-кининовая
Complement subcomponent C1r	Субъединица комплемента C1r	C1r esterase	3.4.21.41 family S1	Комплемент
Complement subcomponent C1s	Субъединица комплемента C1s	C1s esterase	3.4.21.42 family S1	Комплемент
Classical-complement-pathway C3/C5 convertase	C3/C5-конвертаза классического пути комплемента	C3 convertase, C5 convertase, Complement C2	3.4.21.43 family S1	Комплемент
Complement factor I	Фактор комплемента I	C3b inactivator, C3b/C4b inactivator, Complement component C3b inactivator	3.4.21.45 family S1	Комплемент
Complement factor D	Фактор комплемента D	C3 convertase activator, C3 proactivator convertase	3.4.21.46 family S1	Комплемент
Alternative-complement-pathway C3/C5 convertase	C3/C5-конвертаза альтернативного пути комплемента	Complement component C3/C5 convertase (alternative), Complement factor B, Properdin factor B	3.4.21.47 family S1	Комплемент

7.1. Исследование свертывания крови и фибринолиза

В условиях *in vitro* нами было проведено исследование процессов свертывания крови и фибринолиза в присутствии апротинина, СИТ и трипсина. Результаты исследования системы гемостаза приведены в таблице 7.

Таблица 7

Влияние апротинина, СИТ и трипсина на протромбиновое время, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) свертывания крови и время 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.

Результаты эксперимента показали, что апротинин и СИТ в целом оказывают замедляющее действие на свертывание крови и фибринолиз, а протеолитический энзим трипсин оказывает противоположный исследуемым ингибиторам эффект.

Исследование влияния ингибиторов и трипсина на протромбиновое время свертывания крови

Первым этапом исследования процессов гемостаза стало изучение внешнего пути свертывания (протромбинового времени). Результаты исследования активности факторов протромбинового комплекса в плазме крови под воздействием апротинина, СИТ и трипсина представлены в таблице 7.

Во всех контрольных и опытных пробах фибриновые сгустки были одинаковые небольшие гелеобразные. Протромбиновое время в контрольной плазме составило $20 \pm 0,9$ секунд. При добавлении в исследуемую плазму 1,0% раствора апротинина образование сгустка происходило через $21 \pm 0,9$ секунду, а 1,0% раствора СИТ – через $31 \pm 0,9$ секунду. При внесении в опытную плазму 0,1% раствора трипсина образование сгустка фибрина происходило за $13 \pm 0,9$ секунд. В ходе эксперимента установлено, что протромбиновое время свертывания крови человека в условиях *in vitro*:

- 1) уменьшается на 33-35% при воздействии 0,1% раствора трипсина;
- 2) незначительно возрастает (не более 5%) при воздействии 1,0% раствора апротинина;
- 3) возрастает на 50-55% при воздействии 1,0% раствора СИТ.

Исследование влияния ингибиторов и трипсина на активированное частичное тромбопластиновое время свертывания крови

На скорость внутреннего пути свертывания крови, или активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), воздействовали апротинином, СИТ и трипсином (см. табл. 7).

Во всех контрольных и опытных образцах наблюдали образование небольших гелеобразных сгустков. Время свертывания в контрольных пробах составило $36 \pm 1,7$ секунд. В образцах плазмы с 1,0% раствором апротинина образование сгустка происходило в течение $113 \pm 1,8$ секунд, что в 3,2 раза медленнее, чем в контрольной плазме. В образцах плазмы с 1,0% раствором СИТ АЧТВ возросло в 3 раза, по отношению к контролю, и составило $105 \pm 2,7$ секунд. В образцах плазмы с 0,1% раствором трипсина формирование сгустка проходило за $3 \pm 0,9$ секунды, то есть в 10-12 раз быстрее, чем в контрольных пробах. Установлено, что АЧТВ свертывания плазмы крови в условиях *in vitro*:

- 1) снижается на 90-94% (в 10-12 раз) при воздействии 0,1% раствора трипсина;
- 2) возрастает на 210% (в 3,2 раза) при воздействии 1,0% раствора апротинина;
- 3) возрастает на 190% (в 3 раза) при воздействии 1,0% раствора СИТ.

Исследование влияния ингибиторов и трипсина на тромбиновое время свертывания крови

На процесс конечного этапа свертывания крови, или тромбиновое время, воздействовали апротинином, СИТ и трипсином (см. табл. 7). В контрольных пробах значение тромбинового показателя свертывания составило $16 \pm 0,9$ секунд, сгустки были гелеобразные небольшого размера. При добавлении в исследуемую плазму 1,0% раствора апротинина образование сгустка фибрина происходило через $24 \pm 0,9$ секунды, то есть процесс свертывания замедлялся почти на 50% по сравнению с контрольными значениями. В образцах плазмы с апротинином сгустки были аналогичны контролю. Внесение в опытную плазму 1,0% раствора СИТ полностью блокировало процесс свертывания, и формирования сгустка не наблюдалось, лишь в некоторых пробах через 5 минут появлялось слабое помутнение, возможно вследствие образования

небольшого количества фибрина. При внесении в плазму 0,1% раствора трипсина время свертывание значительно ускорилось и составило $2,5 \pm 0,5$.

Таким образом, образование фибрина под действием тромбина в плазме крови человека в условиях *in vitro*:

- 1) ускоряется на 85% в присутствии 0,1% раствора трипсина;
- 2) замедляется на 50% в присутствии 1,0% раствора апротинина;
- 3) не происходит в присутствии 1,0% раствора СИТ.

Исследование влияния ингибиторов и трипсина на фибринолиз

На процесс фибринолиза в плазме крови воздействовали апротинином, СИТ и трипсином. Полученные данные исследования фибринолиза представлены в таблице 7.

На стадии получения эуглобулиновых сгустков наблюдали следующую картину. В контрольных образцах, а также опытных образцах плазмы с апротинином и СИТ, образование рыхлого сгустка проходило в течение получасовой инкубации образцов в водяной бане. Полученные эуглобулиновые сгустки легко растворялись в буфере. При добавлении к исследуемой плазме трипсина мгновенно образовывался небольшой плотный пленчатый сгусток, который простым перемешиванием в буфере не растворялся (требовалось механическое измельчение).

На стадии определения времени лизиса эуглобулиновых сгустков получены следующие данные. Время фибринолиза в контрольных пробах составило $400 \pm 34,7$ секунд. В образцах плазмы с 1%-ми растворами апротинина и СИТ лизис эуглобулинового сгустка не наблюдали. По окончании времени измерения (10 минут) сгустки в пробах с ингибиторами стали немного рыхлыми. В пробах плазмы с 0,1% раствором трипсина лизис сгустка проходил за 182 ± 7 секунды. Таким образом, фактор XII-калликреинзависимый фибринолиз в плазме крови в условиях *in vitro*:

- 1) ускорятся на 50-60% при воздействии 0,1% раствора трипсина;
- 2) не протекает при воздействии 1,0% раствора апротинина;
- 3) не протекает при воздействии 1,0% раствора СИТ.

7.2. Исследование агрегации тромбоцитов

Исследование проводили на обратимой, двухфазной и необратимой видах

Таблица 8

Влияние апротинина, соевого ингибитора трипсина (СИТ) и трипсина на обратимую, двухфазную, необратимую АДФ-инициируемую и двухфазную адреналин-инициируемую агрегации *in vitro*

	Контроль (плазма) (1)	Плазма + Апротинин (2)	Плазма + СИТ (3)	Плазма + Трипсин (4)
Обратимая (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
Двухфазная (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
Необратимая (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
Двухфазная (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.

АДФ-инициируемой агрегации, а также двухфазной адреналин-инициируемой агрегации, для чего были смоделированы условия кровообращения, приближенные к физиологическим. На процесс АДФ- и адреналин-инициируемой агрегации тромбоцитов в плазме крови воздействовали апротинином, СИТ и трипсином. Результаты исследования агрегации представлены в таблице 8.

В ходе исследования установлено, что апротинин и СИТ тормозят процесс агрегации тромбоцитов *in vitro*, а трипсин оказывает обратный ингибиторам эффект.

Обратимая АДФ-инициируемая агрегация

Результаты исследования обратимой (однофазной) АДФ-инициируемой агрегации отображены на рисунке 21 и в таблице 8. В контрольных образцах плазмы фаза набухания тромбоцитов длится не более 4 ± 1 секунд, при этом светопропускание пробы снижается на $1 \pm 0,5\%$. Максимальный уровень агрегации достигает на $55 \pm 4,7$ секунде и составляет $22 \pm 1,8\%$. Далее следовала дезагрегация, которая после седьмой минуты выходила на плато на уровне $11 \pm 1\%$. В пробах плазмы с ингибиторами наблюдалось снижение степени агрегации. В образцах с апротинином фаза набухания длится 6 ± 1 секунд и характеризуется снижением светопропускания на $1,5 \pm 0,5\%$. Уровень максимальной агрегации равен $14 \pm 0,9\%$ и достигается за $55 \pm 4,7$ секунд. В пробах с СИТ время набухания тромбоцитов составляет 5 секунд, а уровень светопропускания в эту фазу снижается на $1,5 \pm 0,5\%$. Уровень максимальной агрегации равен $15 \pm 0,9\%$ и достигается за $55 \pm 4,7$ секунд. Дезагрегация в пробах с апротинином и СИТ шла одинаково, после седьмой минуты уровень ее выходил на плато и составил $5 \pm 1\%$.

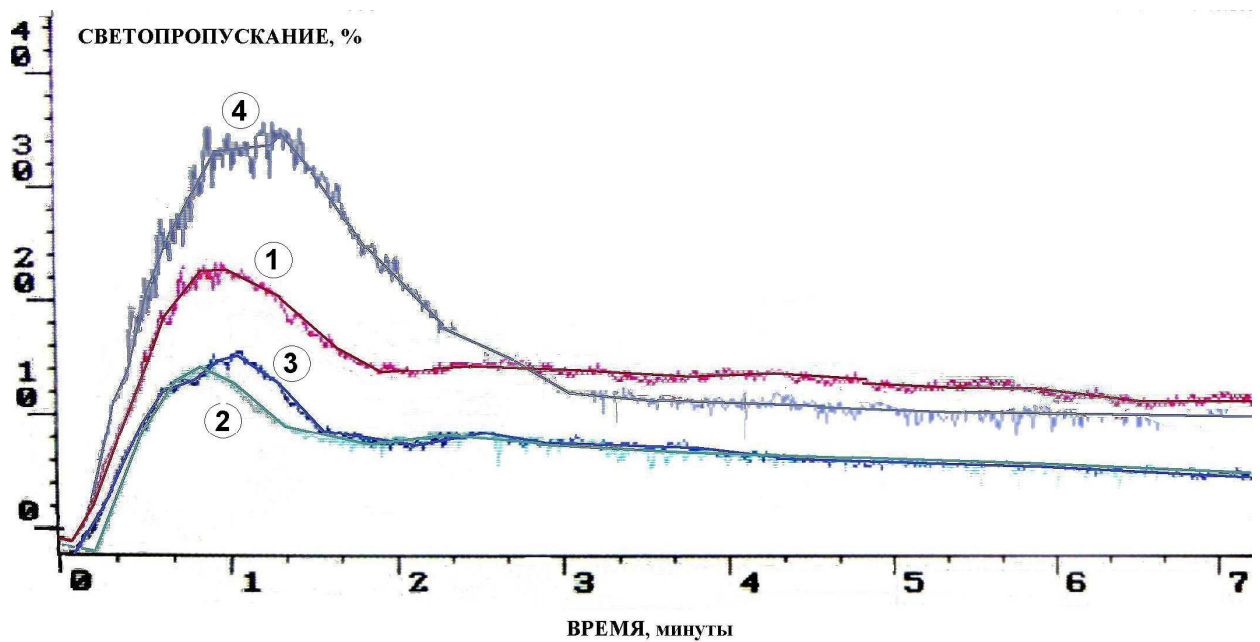


Рис. 21. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на АДФ-инициируемую обратимую (однофазную) агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 5 мкмоль)

1 – контроль; 2 – апротинин 1,0%; 3 – СИТ 1,0%; 4 – трипсин 0,1%.

При внесении в плазму трипсина уровень светопропускания в фазу набухания не изменяется. На длительность набухания тромбоцитов трипсин также не повлиял. Максимальную степень агрегации тромбоцитов в пробах с трипсином регистрировали через 65 ± 15 секунд на уровне $34 \pm 0,9\%$. Затем наблюдали дезагрегацию, выходящую к седьмой минуте на плато на уровне $10 \pm 1\%$.

Двухфазная АДФ-инициируемая агрегация

Результаты исследования двухфазной АДФ-инициируемой агрегации представлены на рисунке 22 и в таблице 8.

В контрольных образцах плазмы время набухания тромбоцитов и сдвиг оптической плотности в фазу набухания аналогичны контролю при обратимой агрегации. Так, набухание тромбоцитов длилось около 4 ± 1 секунд, а оптическая плотность пробы (светопропускание) изменяется на $1 \pm 0,5\%$.

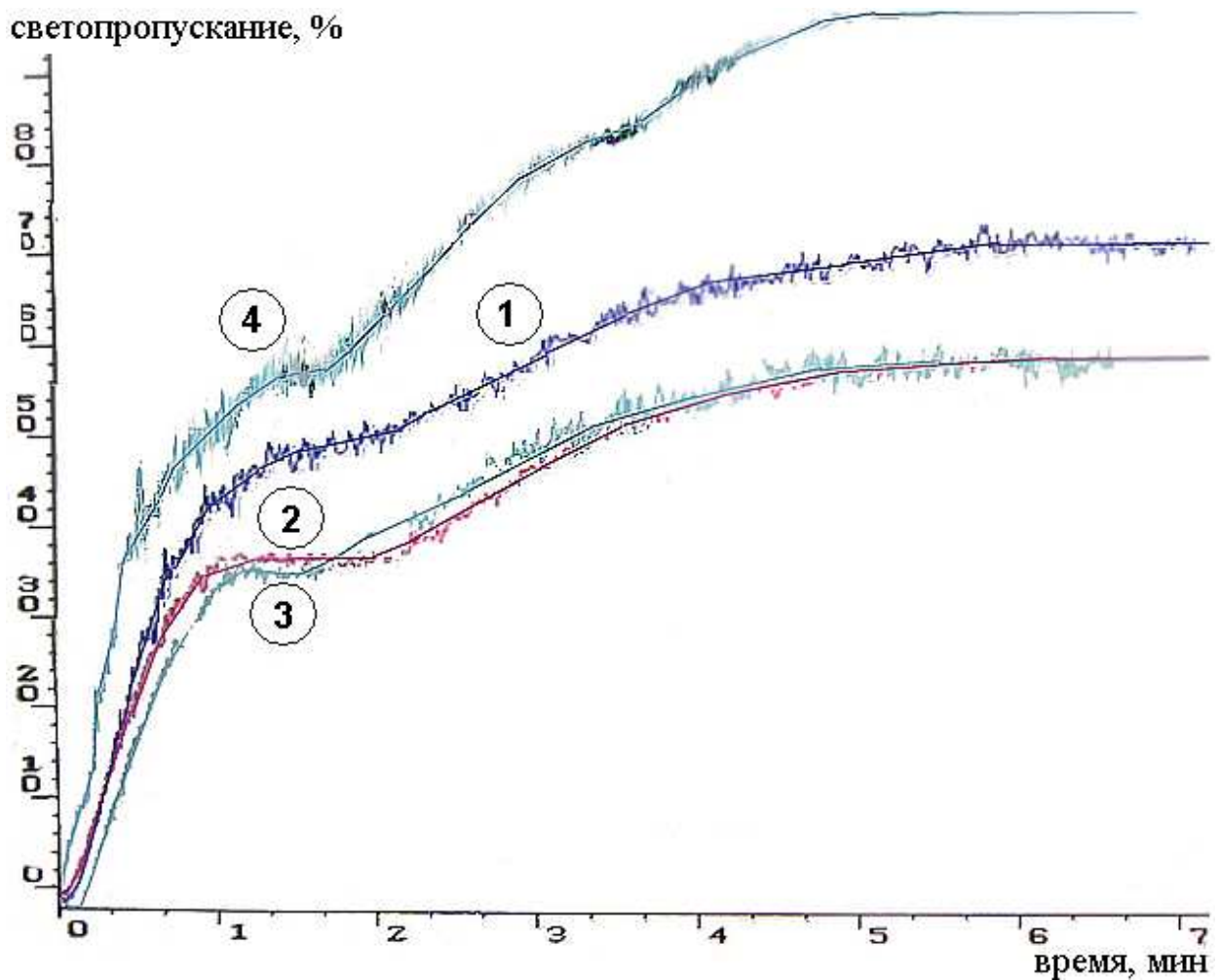


Рис. 22. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на АДФ-инициируемую двухфазную агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 15 мкмоль)

1 – контроль; 2 – апротинин 1,0%; 3 – СИТ 1,0%; 4 – трипсин 0,1%.

Максимальный уровень агрегации на первой фазе составил $48 \pm 1,8\%$ за $85 \pm 4,7$ секунд, на второй фазе – $70 \pm 2\%$ за $350 \pm 9,2$ секунд. В образцах с апротинином и СИТ уровень агрегации тромбоцитов снизился в обеих фазах. По степени снижения агрегации ингибиторы не уступают друг другу. Показатели фазы набухания при добавлении апротинина были в пределах контрольных значений. При добавлении СИТ фаза набухания длилась 6 ± 1 секунд и сопровождалась уменьшением светопропускания на $1,5 \pm 0,5\%$. Максимальный уровень агрегации в пробах с апротинином составил $35 \pm 0,9\%$ за $68 \pm 10,5$ секунд на первой фазе, и $56 \pm 2\%$ за $325 \pm 9,2$ секунд на второй фазе, с СИТ – $34 \pm 1\%$ за 70 ± 9 секунд и $58 \pm 1\%$ за $320 \pm 9,3$ секунд, на первой и второй фазах соответственно.

При внесении в плазму трипсина фазу набухания тромбоцитов не наблюдали, но на фазах первичной и вторичной агрегации отмечено увеличение степени агрегации. В пробах с трипсином уровень максимальной первичной агрегации составил $57 \pm 3\%$ (за 80 ± 10 секунд), вторичной агрегации – $99 \pm 1\%$ (за $310 \pm 9,2$ секунд). Данный тип агрегации является необратимым процессом, и после достижения максимума агрегации во второй фазе во всех контрольных и исследуемых пробах дальнейших изменений светопропускания не наблюдали.

Необратимая АДФ-иницируемая агрегация

Результаты исследования необратимой АДФ-иницируемой агрегации представлены в таблице 8 и на рисунке 23.

В контрольных образцах плазмы фаза набухания тромбоцитов не отличается от таковой при обратимой и двухфазной агрегации. Время набухания составляло 4 ± 1 секунды, а степень характеризовалась изменением светопропускания проб на $1 \pm 0,5\%$. Уровень агрегации достигал максимального значения в $49 \pm 0,9\%$ за 400 ± 18 секунд.

Исследуемые ингибиторы апротинин и СИТ снижали степень необратимой агрегации, но влияние последнего оказалось немного сильнее. Время и степень набухания тромбоцитов в присутствии ингибиторов не отличались от контроля. Максимальный уровень агрегации с апротинином составил $33 \pm 0,9\%$ и был достигнут за $410 \pm 9,3$ секунд, с СИТ – $29 \pm 0,9\%$ за $410 \pm 9,3$ секунд.

При добавлении к плазме трипсина фазы набухания тромбоцитов не наблюдали. Максимальная агрегация с трипсином достигает уровня 100% за $210 \pm 26,4$ секунд. В контрольных и опытных пробах дезагрегации не наблюдали.

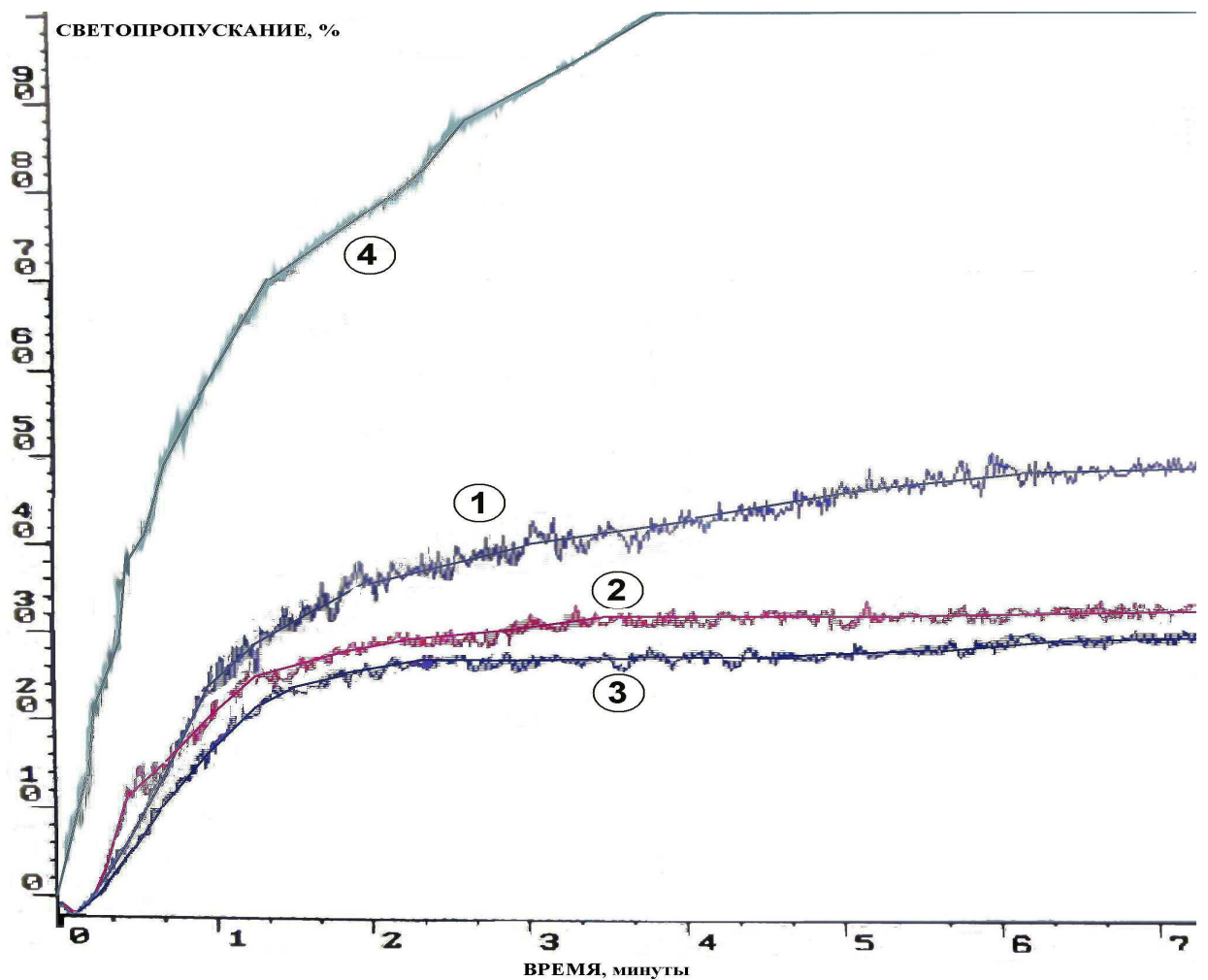


Рис. 23. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на АДФ-инициируемую необратимую агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 25 мкмоль)

1 – контроль; 2 – апротинин 1,0%; 3 – СИТ 1,0%; 4 – трипсин 0,1%.

Двухфазная адреналин-инициируемая агрегация

Полученные данные представлены на рисунке 24 и в таблице 8.

В контрольных образцах максимальный уровень агрегации на первой фазе достигал $23 \pm 0,9\%$ за $110 \pm 9,3$ секунд, на второй фазе – $47 \pm 2,4\%$ за $390 \pm 9,3$ секунд. Кривые агрегации с апротинином и СИТ оказались очень схожими. Так, максимальная агрегация в присутствии апротинина или СИТ в первую фазу составляла $16 \pm 1,8\%$ за $125 \pm 13,1$ секунд, во вторую фазу около 44% за 430 ± 18

секунд. Влияние ингибиторов более выражено в первой фазе агрегации. К концу второй фазы действие ингибиторов несколько снижалось. Внесение в плазму трипсина увеличивало степень агрегации обеих фаз агрегации. Уровень максимальной первичной агрегации в пробах с трипсином достигал отметки $32 \pm 0,9\%$ за $130 \pm 9,3$ секунд, вторичной – $55 \pm 0,9\%$ за $435 \pm 16,2$ секунд. Дезагрегацию, как и в случае с двухфазной АДФ-инициируемой агрегации, не наблюдали ни в одной пробе.

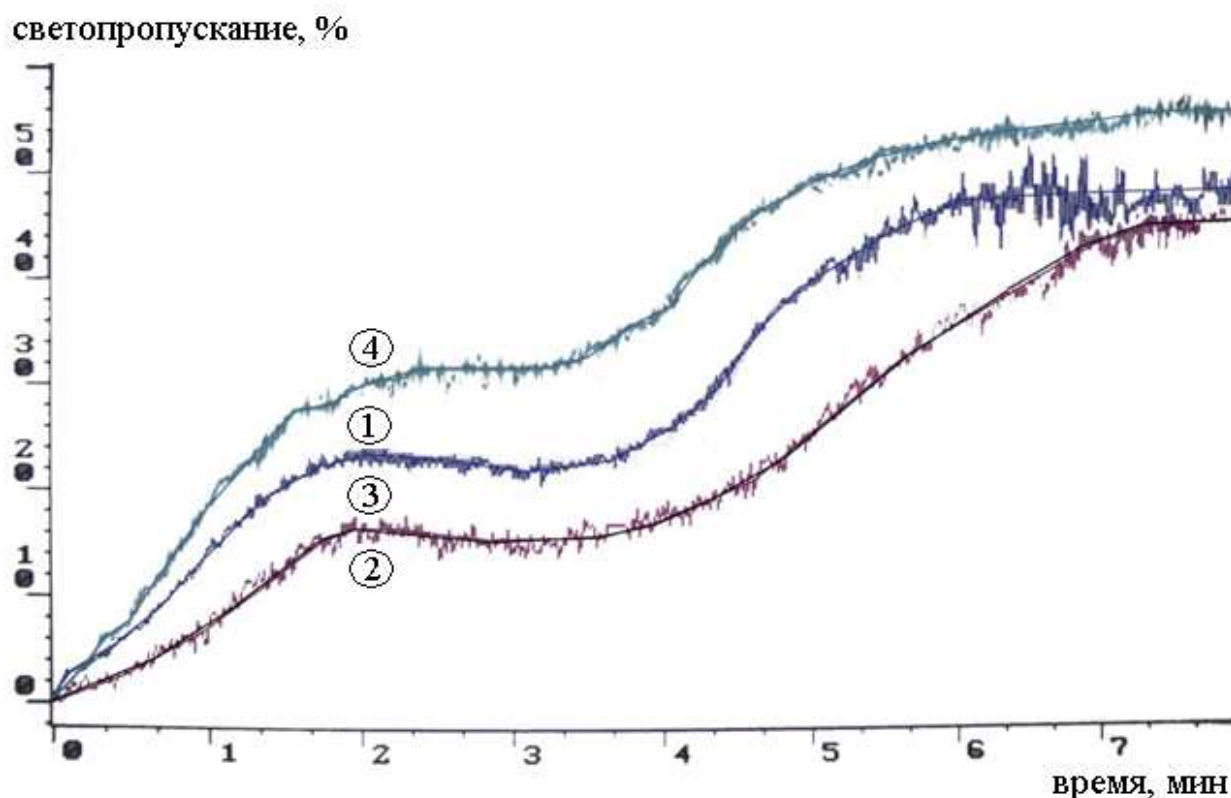


Рис. 24. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на адреналин-инициируемую двухфазную агрегацию *in vitro* (адреналина 25 мкмоль)

1 – контроль; 2 – СИТ 1,0%; 3 – апротинин 1,0%; 4 – трипсин 0,1%.

Таким образом, установлено, что степень агрегации тромбоцитов при обратимой, двухфазной и необратимой АДФ-инициируемых агрегациях *in vitro*:

- 1) повышается в присутствии 0,1% раствора трипсина;
- 2) снижается при воздействии 1,0% раствора апротинина;
- 3) снижается при воздействии 1,0% раствора СИТ.

Также установлено, что степень агрегации тромбоцитов адреналин-инициируемой двухфазной агрегации:

- 1) повышается в присутствии 0,1% раствора трипсина;
- 2) снижается в присутствии 1,0% раствора апротинина или 1,0% раствора СИТ.

7.3. Исследование системы комплемента

Одним из объектов в данном сравнительном исследовании апротинина и СИТ, мы выбрали систему комплемента. Результаты исследования представлены в таблице 9 и на рисунках 25 и 26.

Таблица 9

Влияние апротинина, соевого ингибитора трипсина (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 $P_{1-4}<0,02$

Степень гемолиза достигала 100% во всех контрольных и исследуемых пробах. В контрольных пробах время лагфазы предшествующей гемолитическому распаду эритроцитов составило 3,5±0,5 минуты, а общее время (включая время лагфазы) гемолиза – 8,5±1,5 минут. В присутствии ингибиторов исследуемые показатели гемолиза (время лагфазы и общее время гемолиза) были зарегистрированы в диапазоне контрольных значений. В пробах с 0,01, 0,1 и 1,0%-ми растворами апротинина и СИТ лагфаза длилась 3,2±0,15 минуты, а общее время гемолиза составляло 7,25±0,25 минут. Оба

ингибитора не повлияли на скорость и степень комплемент-инициируемого гемолиза эритроцитов.

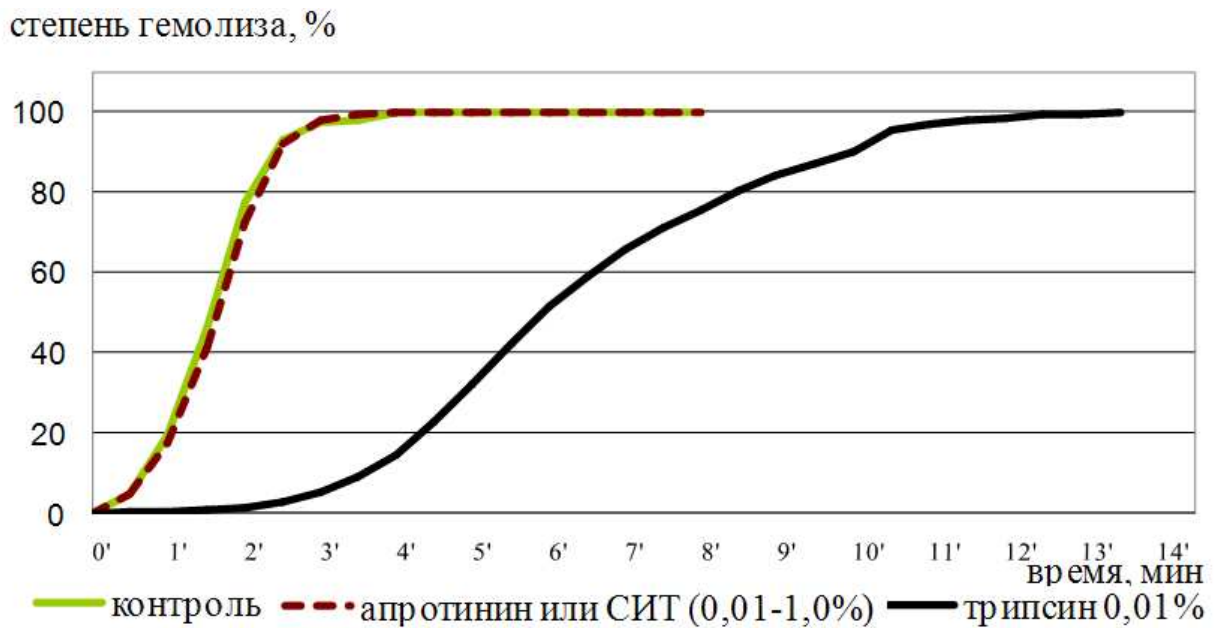


Рис. 25. Типичные кривые гемолитической активности комплемента в присутствии аprotинина, соевого ингибитора трипсина (СИТ) и трипсина *in vitro* (лагфаза не показана)

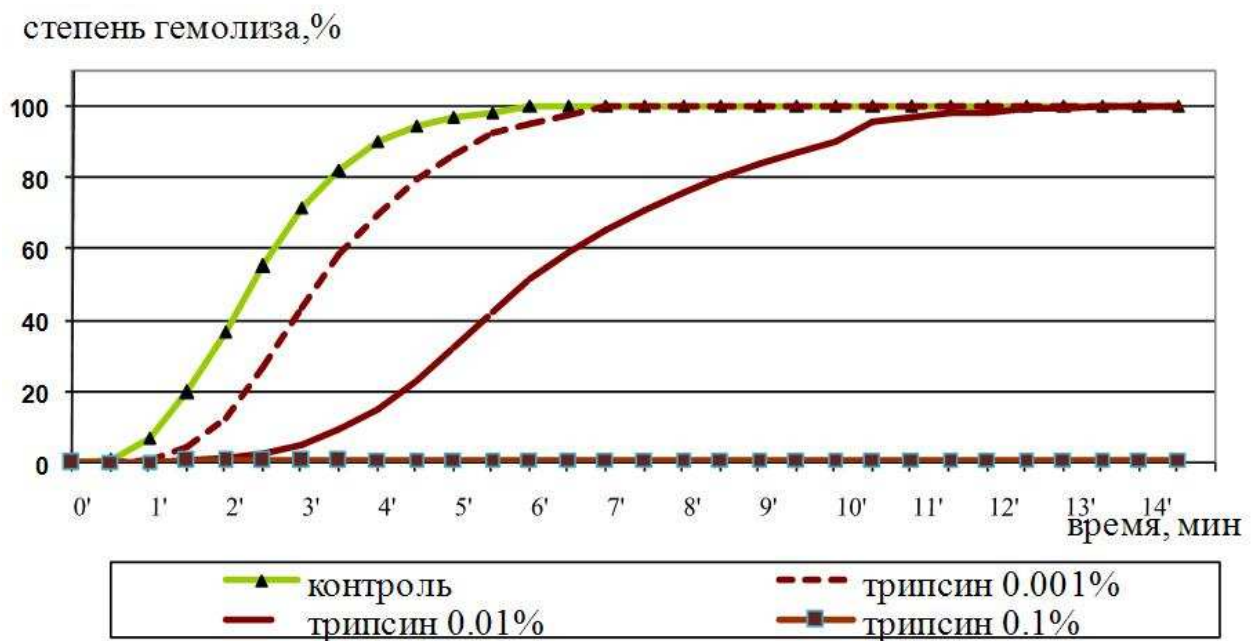


Рис. 26. Типичные кривые гемолитической активности комплемента в присутствии трипсина *in vitro* (лагфаза не показана)

Внесение трипсина замедляло гемолиз, однако уровень гемолизированных эритроцитов был одинаковым с контрольными пробами (см. рис. 26).

Таким образом, было установлено, что скорость гемолиза эритроцитов под действием системы комплемента:

- 1) снижается в присутствии трипсина и зависит от его концентрации;
- 2) не изменяется при воздействии апротинина в концентрации 0,01-1,0%;
- 3) не изменяется при воздействии СИТ в концентрации 0,01-1,0%.

Глава 8. Исследование влияния приема изолята соевого белка, содержащего соевый ингибитор трипсина, на уровень общей протеолитической и трипсин-ингибиторной активности в сыворотке крови людей

О влиянии соевого питания на процессы протеолиза судили по общей протеолитической и общей трипсин-ингибиторной активности в сыворотке крови.

Для корректной оценки показателей общей активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в сыворотке крови, было проведено определение содержания активных ингибиторов в изоляте соевого белка. Определение антитрипсиновой активности изолята показало, что 1 мг изолята содержит $1,4 \pm 0,1$ ингибиторных единицы. В таблице 10 представлены данные измерения протеолитической и трипсин-ингибиторной активности сыворотки крови людей до и после приема соевого изолята.

Таблица 10

Уровень общей протеолитической и трипсин-ингибиторной активности сыворотки крови здоровых людей до и после 2 месяцев приема соевого изолята

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

Из полученных результатов видно, 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 также на 21% ($p < 0,01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Биоинформационное исследование ингибиторов. Анализ электронных баз данных белков, обнаруженных нами в Интернете, показал, что содержащаяся в них информация является достоверной и не противоречит современным научным представлениям. Указанные базы данных белков постоянно пополняются создателями баз и независимыми исследователями. В 2006 году (рис. 27) количество структур молекул в базе Protein Data Bank составляло около 35 500, а в базе Swiss-Prot/TrEMBL около 2 900 000 (Silveira et al., 2007). Сегодня база Protein Data Bank содержит более 40 тыс., а Swiss-Prot/TrEMBL – 3 млн молекулярных структур. Нами было установлено, что на сегодняшний день в базах данных белковых структур по апротинину содержится больше информации, чем по СИТ.

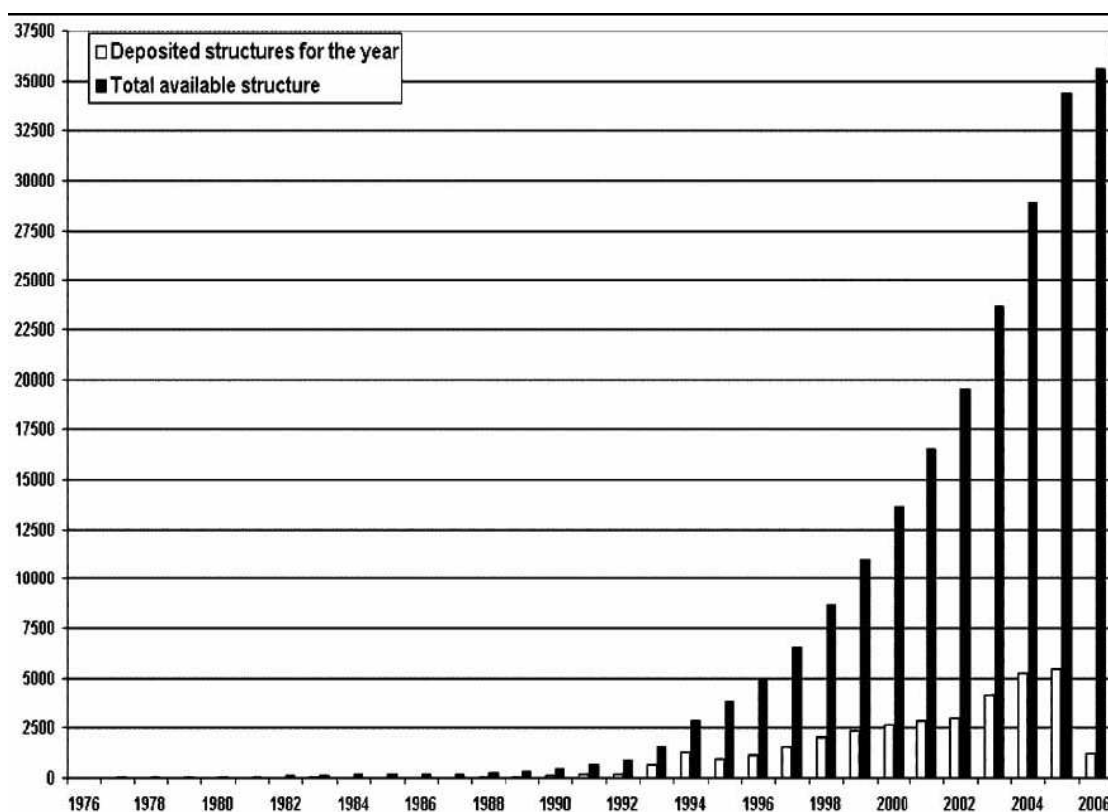


Рис. 27. Пополнение депозитных и доступных структур белков в базе данных Protein Data Bank в период с 1976 по 2006 гг. (Silveira et al., 2007)

Поиск компьютерных программ моделирования молекул показал большое разнообразие подобных продуктов биоинформатики. Среди них можно выделить такие, как: PASS, ONIX, 3D-QSAR, Sybyl, Tripos, Procheck, 3D-MATRIX, GenMesh, GRID, DOCK, COMPOSER, MOPAC, QSAR. Данные программы позволяют: прогнозировать вероятный спектр биологической активности; осуществлять поиск соединения с необходимым свойством; отсеивать «ненужные» соединения; подбирать соединения-гомологи; моделировать структурные уровни молекул и их части; идентифицировать элементы вторичной структуры; сравнивать пространственные структуры молекул и их отдельных участков; генерировать конформеры; моделировать взаимодействие лиганда с макромолекулой-мишенью; моделировать молекулярную динамику моделей молекул и комплексов соединений и т.д. Вышеперечисленные программы представлены в виде отдельных и комплексных продуктов вычислений, позволяющих изучать как отдельные молекулы, так и несколько тысяч молекул (сюда входит широкий спектр низко- и высокомолекулярных веществ) одновременно с учетом заданных требований. Интернет-версии программ находятся по электронным адресам <http://www.ibmh.msk.su/>, <http://www.tripos.com/>; <http://lmgdd.ibmh.msk.su/> и т.д. Наряду с такими вычислительными программами разработано вспомогательное обеспечение (Caveat, Clix, Ludi) для поиска в базах данных. Среди интернет-серверов, позволяющих исследовать белковые последовательности, следует выделить: ClustalW, Compass, UniProt, Blast.

Известно, что для сравнения гомологии белков их последовательности выравнивают и сравнивают эквивалентные аминокислотные остатки (Pazos, Bang, 2006). При помощи компьютерной программы мы получили данные, указывающие на сходство первичных структур апротинина и СИТ. Низкое сходство (10% на уровне целых молекул) последовательностей, показанное BioEdit, мы прогнозировали, учитывая большую разницу в длине полипептидных цепей ингибиторов (апротинин содержит 58 аминокислотных остатков, СИТ – 181 остаток). При сравнении структуры белков можно

применять выравнивание их отдельных фрагментов (Степанов, 1998). Поэтому, нами была предпринята попытка сравнения гомологичности отдельных участков СИТ и апротинина. Данное сравнение показало сходство различных фрагментов исследуемых ингибиторов равное 21, 24 и 35%. Согласно представлениям классической протеомики, эволюционно родственные белки, независимо от количества аминокислот, входящих в их состав, и различий третичной структуры, имеют одинаковые (консервативные) области (домены), определяющие функциональность белков. Например, в родственных глутамилэндопептидазах бактерий консервативны только пять аминокислотных остатков из 215 (Степанов, 1998). Парные сравнения трипсина, эластазы, химотрипсина и тромбина показывают около 40% идентичности их аминокислотных последовательностей, а первые три имеют одинаковую укладку цепи (Шульц, Ширмер, 1982). Если доля совпадающих аминокислотных остатков превышает 25-30%, это указывает на однотипность способа свертывания полипептидной цепи (Степанов, 1998). Результаты, полученные таким биоинформационным методом, часто эквивалентны по точности рентгеновскому исследованию с низким структурным разрешением (Xiang, 2006). Поэтому полученные нами данные позволяют рассматривать апротинин и СИТ как структурно подобные белки.

С помощью других компьютерных программ нами было установлено, что исследуемые белки-ингибиторы являются ингибиторами ренина, ангиотензин-превращающего и эндотелин-превращающего ферментов. В литературе мы не встретили прямого подтверждения способности апротинина и СИТ ингибировать пептидазы, указанные программой. Однако известно, что по своей химической природе ренин, ангиотензин-превращающий и эндотелин-превращающий ферменты являются пептидазами. В свою очередь исследуемые белки и являются ингибиторами пептидазы протеаз. Ренин и ангиотензин-превращающий фермент являются компонентами ренин-ангиотензиновой системы, которая участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов. При недостаточном снабжении кровью почек из ангиотензиногена под действием

ренина образуется декапептид ангиотензин I. Ангиотензин-превращающий фермент конвертирует ангиотензин I в октапептид ангиотензин II, который вызывает прямое суживающее действие на артерии и вены и в результате повышается кровяное давление. Ангиотензин-превращающий фермент также расщепляет нонапептид калликреин-кининовой системы – брадикинин, оказывающий противоположенное ангиотензину II действие (Соловьева, Елисеева, Локшина, 1995; Елисеева, 2000; Яровая, 2001).

Действие ангиотензин-конвертазы не ограничивается регуляцией кровяного давления. Фермент вовлечен в реализацию таких процессов как обмен нейропептидов, пролиферацию клеток, репродуктивные процессы, а также защитные и иммунные реакции организма (Елисеева, 2000).

Что касается эндотелин-конвертазы, то данный фермент представляет собой эндопептидазу, впервые полученную из микросом легких крысы и затем обнаруженную у многих млекопитающих (Гомазков, 1999). Эндотелин-конвертаза обладает гипотензивным действием. Ее физиологическое действие заключается в активации предшественника эндотелина – пептида, который вызывает спазм сосудов (Kuchan, Frangos 1993; Gibbons, Dzau, 1994), понижает реактивность тромбоцитов (Levin, 1995), а также участвует во многих других физиологических процессах (Гомазков, 1999; Lambert et al., 2008; Schulz et al., 2009).

Таким образом, апротинин и СИТ, ингибируя работу ренина, конвертаз ангиотензина и эндотелина, теоретически могут воздействовать на промежуточные (по времени) регуляторные механизмы системной гемодинамики (ренин-ангитензиновая система), механизмы регуляции регионального кровообращения и капиллярной проницаемости, а также ряд других физиологических процессов, сопряженных с работой данных ферментов. На сегодняшний день известно, что некоторые эндогенные ингибиторы протеолитических ферментов участвуют в регуляции вазоактивных систем организма человека (Суханова, Кондратьева, Спирина, 2004).

Программа PASS способна обнаруживать наличие токсичности, мутагенности, канцерогенности и тератогенности у исследуемых веществ. Вышеперечисленные эффекты для апротинина и СИТ программой показаны не были. Сообщений о подобных эффектах панкреатического и соевого ингибиторов в литературе нами не найдено. Поэтому, учитывая, что разработчики программы PASS указывают достоверность данных более 80%, полученные нами результаты косвенно свидетельствуют об однотипности биологического действия апротинина и СИТ.

В тестировании, изучении функций, модификации, исследовании механизма действия белковых структур большую ценность представляет их трехмерная структура (Blundell et al., 2006; Pazos, Bang, 2006; Silveira et al., 2007). Полученные электронные пространственные структуры апротинина и СИТ мы планировали использовать для определения их гомологии на уровне третичной организации белков, а также поиска потенциальных молекул-мишеней данных ингибиторов среди известных протеолитических ферментов организма человека. Однако выполнить поставленную задачу не удалось из-за отсутствия в Интернете в свободном доступе необходимых компьютерных программ. В целом, полученные нами данные биоинформатики указывают на однотипность строения отдельных участков последовательностей апротинина и СИТ, а также их биологической активности, что явилось предпосылкой дальнейших экспериментальных сравнительных исследований данных ингибиторов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Трипсин-ингибиторная активность ингибиторов. При расчете трипсин-ингибиторной активности на мг ингибитора апротинин более чем в 2 раза активней СИТ ($p < 0,0002$). Ингибиторная активность ϵ -аминокапроновой кислоты почти на 2 порядка ниже, чем у апротинина, и в 40 раз ниже, чем у СИТ. По способности тормозить БАЭЭ-эстеразную активность трипсина D-лизин практически не отличается от ϵ -аминокапроновой кислоты.

Молекулярная масса СИТ (20 100) в 3 раза выше молекулярной массы апротинина (6 514). Поэтому, при расчете на моль ингибитора трипсин-

ингибиторная активность СИТ (чуть более 1,0 ИЕ/нмоль) оказалась несколько выше, чем у апротинина (около 1,0 ИЕ/нмоль) (см. рис. 19). Очевидно, что ингибиторная активность низкомолекулярных ингибиторов при расчете на моль вещества будет ничтожно мала. На основании полученных данных можно считать, что апротинин и соевый ингибитор не уступают друг другу в способности ингибировать трипсин в условиях *in vitro*.

Исследование систем гемостаза и комплемента. Исследование показало однотипное действие апротинина и СИТ на свертывание крови, фибринолиз, агрегацию тромбоцитов. Протеолитический фермент трипсин оказывает противоположный ингибиторам эффект, ускоряя вышеуказанные процессы.

Работа протромбинового комплекса складывается из уровня активных форм проконвертина (фактор VII), протромбиназы (фактор X) и протромбина (фактор II), которые участвуют в последовательной активации друг друга. Аналогичный им по природе трипсин, вероятно, способствовал протеолитическому каскаду активации внешнего пути свертывания. Кроме того, известно, что трипсиноподобный энзим тромбин способен активировать фактор свертывания V (Потетина и соавт., 2001; Arbogast, 2004), входящего в протромбиновый комплекс. Трипсин мог оказать аналогичный тромбину эффект, усилив активность проакцелерина (фактор V), тем самым ускорив весь процесс свертывания. Учитывая природу факторов протромбинового комплекса, мы предположили, что апротинин и СИТ будут воздействовать на внешний путь свертывания через факторы II, VII и X, что приведет к увеличению времени свертывания. Однако результаты показали, что только СИТ статистически достоверно увеличивает протромбиновое время свертывания. На способность СИТ увеличивать протромбиновое время свертывания указывают такие работы Г.В. Андреев и Б.А. Кудряшова (1961a, 1961b), в которых сообщается, что ингибитор из соевых бобов может препятствовать действию тканевого тромбопластина и тромбина *in vitro* и *in vivo* у крыс. Химический препарат СИТ ингибирует фактор свертывания X

(каталог Sigma, 2006), что также подтверждает обнаруженный нами эффект СИТ. Известно, что апротинин обладает широким спектром действия, но не подавляет активность активаторов плазминогена (Веремеенко, Голобородько, Кизим, 1988). Присутствие в плазме апротинина практически не повлияло на активность протромбинового комплекса, а также запускающий весь каскад свертывания тканевый активатор плазминогена. Причиной такого эффекта апротинина может являться его специфичность в отношении протеолитических ферментов, отвечающих за внешний путь свертывания.

Трипсин снизил АЧТВ, видимо, будучи однотипным с большинством сериновых энзимов, отвечающих за процесс свертывания по данному пути, как и в случае с протромбиновым показателем. Внутренний путь свертывания крови чувствителен к следующим факторам свертывания: II, V, VIII, IX, X, XI, XII и фибриногену. Часть этих факторов являются сериновыми протеазами (II, IX, X, XI, XII), и возможно, могут являться для апротинина и СИТ мишенями. Результаты исследования показали, что данные ингибиторы действительно могут увеличивать АЧТВ свертывания и практически в равной степени. Ранее В. Дитрих (Dietrich, 1989) и соавторы отметили, что применение в области кардиохирургии фармакологических препаратов на основе панкреатического ингибитора протеаз, удлиняет активированное время свертывания. О возможной способности соевого ингибитора инактивировать фактор Кристмаса (фактор IX), обеспечивающий протекание промежуточных этапов первой фазы свертывания, высказывали предположение Г.В. Андреев и Б.А. Кудряшов (1961a). Известно, что СИТ может тормозить фактор X (каталог Sigma, 2006). В литературе все чаще встречаются сообщения о способности различных белков, принадлежащих к семейству серпинов, воздействовать на ход свертывания по внутреннему пути. Недавние исследования, показали, что кроме регуляции плазменных компонентов защитной системы организма, С1-ингибитор участвует в процессах гемостаза, подавляя активность фактора свертывания XII (Bracho, 2005; Cicardi et al., 2005, 2007; Netti et al., 2005; Bernstein, 2008). Ингибиторы, вырабатываемые железами клещей, обладают

антигемостатическими свойствами (Pierre-Paul et al., 2006), а ингибитор пиявок подавляет фактор X (Басанова, Баскова, Завалова, 2002). Данные факты согласуются с полученными нами результатами, но остается неясным, какие именно сериновые факторы свертывания по внутреннему пути являются ключевыми точками приложения для апротинина и СИТ.

Гирудин пиявок и его синтезированный аналог являются прямыми ингибиторами тромбина, и эффективно задерживают свертывание крови (Connors 3rd, 2004; Lehman, Chew, 2006). Данные, полученные рядом исследователей (Tans et al., 1987; Доценко и соавт., 1990; Franco et al., 2004; Sagili, Pankiw, Zhu-Salzman, 2005; Остапченко, 2006; каталог Sigma, 2006), говорят о том, что ингибиторы из сои тормозят активность трипсина и трипсиноподобных ферментов (химотрипсина, калликреины плазмы, энтеропептидазы, протеаз насекомых). Апротинин также обладает широкой специфичностью, ингибируя действие трипсина, калликреинов ткани и плазмы, эластазы, энтеропептидазы, урокиназы (Михайлов, 2002; Остапченко, 2006; Smith, Kocher, Hunt, 2009; Sun et al., 2009). Поэтому мы предположили, что образование сгустка под действием тромбина (тромбиновое время свертывания), вероятно, будет замедляться в присутствии исследуемых ингибиторов. Наши предположения оказались верными – оба ингибитора препятствовали образованию фибринового сгустка. Однако установлено, что апротинин существенно уступает СИТ по силе воздействия на тромбиновое время свертывания плазмы крови. Тромбин катализирует образование фибрина, поэтому внесение в плазму однотипного ему белка – трипсина явилось причиной сокращения времени свертывания.

В процессе калликреин-зависимого фибринолиза происходит активация «моста» фактор XII – калликреин – плазминоген. Последним звеном этого «моста» является плазмин, который образуется из его предшественника плазминогена и осуществляет лизис сгустка. Участники активации плазмينا (фактор XII, калликреин) являются сериновыми протеазами, как и сам плазмин. Так как трипсин тоже является сериновой протеазой, это объясняет мгновенное

образование сгустка при внесении трипсина на стадии получения сгустка, и дальнейшее ускорение стадии самого фибринолиза. Известно, что подобный трипсину тромбин катализирует образование фибрина (Arbogast, 2004), а сам трипсин способен гидролизовать многие белки плазмы. Функциональную активность тканевого активатора пламиногена, урокиназы, пламина и других протеаз могут подавлять α_2 -АП, α_2 -МГ, α_1 -АТ и антитромбин III (Подорольская и соавт., 1996), являющиеся ингибиторами протеолитических ферментов. С1-ингибитор снижает активность калликреина (Bracho, 2005; Cicardi et al., 2005; Nettis et al., 2005; Bernstein, 2008). СИТ тормозит активность пламина человека (Доценко и соавт., 1990), а апротинин снижает повышенный уровень фибринолиза, связанный с аномалиями свертывания крови у людей (Kockar et al., 2005). Ингибирование пламина и трипсиноподобных протеаз апротинином может приводить к первичному подавлению фибринолиза (Михайлов, 2002). В экспериментах *in vitro* Е.А. Бородин и соавторы (Borodin et al., 2004a, 2004b) отмечали статистически достоверное замедление скорости растворения тромба соевым ингибитором трипсина. Вышеуказанные данные по исследованию антифибринолитических свойств серпинов позволили нам предсказать ингибирующее действие апротинина и СИТ на лизис эуглобулинового сгустка.

Агрегация тромбоцитов является частью гемостаза, представляющего собой сложную протеолитическую систему крови. В процессе активации агрегации тромбоцитов участвуют сериновые протеазы. Ингибиторы факторов свертывания крови являются сегодня основным объектом исследования в работах, посвященных регуляции агрегации тромбоцитов (Klauss, Spannagl, 2006; Jennings, Saucedo, 2008). Поэтому мы поставили перед собой задачу изучить влияние апротинина и СИТ на процесс агрегации тромбоцитов. Сила влияния ингибиторов оказалась одинакова в случае с обратимой, двухфазной АДФ-инициируемых и двухфазной адреналин-инициируемой агрегациях, а в случае с необратимой АДФ-инициируемой агрегацией степень влияния СИТ незначительно выше, чем у апротинина. Следует отметить, что адреналин-инициируемой агрегации не предшествует набухание тромбоцитов, поэтому

фазу набухания на всех контрольных и опытных агрегатограммах не прослеживали.

На обнаруженные нами антиагрегационные свойства аprotинина и СИТ косвенно указывают недавние работы ряда авторов. У белков-серпинов, ингибирующих факторы свертывания, обнаружены регуляторные способности в отношении тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза (Nutescu, Shapiro, Chevalier, 2006; Lepor, 2007; Hoppensteadt et al., 2008). Ингибиторы из желез кровососущих животных (клопы, пиявки, мухи) препятствуют адгезии и агрегации тромбоцитов (Басанова, Баскова, Завалова, 2002). Е.А. Бородиным и соавторами (Borodin et al., 2004a), было показано, что СИТ в условиях *in vitro* уменьшает скорость и степень адреналин-инициируемой агрегации тромбоцитов. В образцах плазмы с СИТ исследователи отмечали уменьшение уровня максимальной агрегации и уровня агрегации на 5 минуте регистрации, а также увеличение времени достижения максимальной агрегации и снижение скорости агрегации на первых минутах измерения.

Увеличение агрегабельности тромбоцитов в присутствие трипсина можно объяснить тем, что в процессе агрегации участвуют сериновые протеазы крови. На сегодняшний день известно, что трипсиноподобный фермент тромбин способен катализировать агрегацию тромбоцитов (Arbogast, 2004). Среди мембранных рецепторов, запускающих связывание тромбоцитов, имеются рецепторы, реагирующие на протеиназы, в частности тромбин (Басанова, Баскова, Завалова, 2002).

Система комплемента представляет собой сложную систему, состоящую из белков семейства сериновых протеиназ (субъединицы комплемента C1r и C1s, C3/C5-конвертаза классического пути, факторы комплемента I и D). Как и другие протеолитические системы организма, комплемент активируется при участии ограниченного протеолиза. Поэтому мы предполагали, что исследуемые ингибиторы смогут препятствовать активации или работе комплемента как протеолитическому процессу, тем самым увеличив время гемолитического распада или уменьшив степень гемолиза. Однако результаты

эксперимента не показали изменений скорости и степени гемолиза при добавлении апротинина и СИТ. Известно, что часть компонентов системы комплемента не имеют естественных ингибиторов серпинов (Sim, Tsiftoglou, 2004). Отсутствие воздействия ингибиторов на работу комплемента, вероятно, обусловлено специфичностью первых к данным субстратам (протеазам комплемента).

В случае с трипсином была обнаружена зависимость скорости гемолиза от концентрации вносимого в пробу раствора трипсина. При инкубировании комплемента с 0,001% раствором трипсина лагфаза гемолиза длилась $4,25 \pm 0,25$ минуты, а общее время гемолиза составляло $11,5 \pm 0,5$ минут. При увеличении концентрации до 0,01% лагфаза протекала $4,25 \pm 0,25$ минуты, а общее время составило $15,5 \pm 1,6$ минут, т.е. происходило замедление процесса гемолиза, а при увеличении концентрации до 0,1% гемолиз был полностью блокирован (см. рис. 26). П.П. Бельтюков и соавторы (2003) установили, что трипсиноподобные ферменты панкреатический калликреин и эластаза эффективно гидролизуют компонент С3 комплемента человека в условиях *in vitro*, угнетая скорость комплемент-опосредованного гемолиза. Учитывая, что трипсин и подобные ему ферменты способны гидролизовать многие белки плазмы крови (Fritz, Jochum, 1984), вероятно, что трипсин тормозит гемолитическую активность комплемента подобно калликреину и эластазе, подвергая протеолитическому распаду пептидные компоненты этой неспецифической защитной системы белков.

Исследование влияния приема изолята соевого белка на протеолитический и ингибиторный потенциал сыворотки крови людей. Соя культивируется как продовольственный продукт более 3000 лет (Mořa et al., 2007) и входит в пятерку растений, полезные биологические эффекты которых подтверждены многочисленными научными исследованиями (Bent, 2008). В последние десятилетия в странах запада и в России соевые продукты составляют большую долю в рационе питания людей (Бородин, Аксенова, Анищенко, 2000; AbuMweis, Jones, 2008; Retelny, Neuendorf, Roth, 2008).

Некоторые продукты питания из сои включают неаллергенный соевый ингибитор Боумана-Бирка, который в 1999 году официально признан компонентом продовольственных продуктов (Losso, 2008). В рамках исследования физиологических процессов системы крови, затрагивающих протеолиз, мы поставили перед собой задачу выяснить, как длительное употребление в пищу продуктов, содержащих активные ингибиторы протеолитических ферментов, может влиять на протеазно-ингибиторную систему крови человека. В качестве такого продукта был выбран изолят соевого белка, обладающий антипротеолитической активностью. По характеристикам, указанным производителями, изолят содержит более 90% белка. До 10% от общей белковой массы сои приходится на ингибиторы (Моссе, Пернолле, 1986). В процессе приготовления изолята соя подвергается сильной термической обработке (длительность и уровень температурного воздействия нам не известен), в ходе которой ее биологически активные компоненты могут инактивироваться, в том числе и соевые ингибиторы протеаз. Известно, что около 20% соевого ингибитора трипсина обладают термостабильностью (Kennedy, 1998), что позволяет предположить наличие остаточной антипротеолитической активности ингибиторов в готовом изоляте соевого белка. Проведенные нами опыты показали наличие трипсин-ингибиторных свойств соевого изолята (около 1,5 ИЕ/мг). Для примера 1 мг чистого СИТ обладает активностью равной около 60 ингибиторных единиц. Таким образом, активный СИТ составляет около 2,7% от общей массы изолята, соответственно добровольцы получали приблизительно по 2,7 грамма активного соевого ингибитора на каждые 100 грамм изолята. Нам удалось приблизительно рассчитать дозу употребляемого соевого ингибитора – ежедневно каждый человек принимал по 30 грамм соевого изолята, что соответствует около 0,85 грамма активного ингибитора (ориентировочно 51 850 ИЕ), всего 1,8 кг изолята или около 50 грамм активного ингибитора за весь эксперимент. После 2-х месячного приема такого количества активного ингибитора в сыворотке крови

снижился уровень протеолитической активности на фоне увеличения ингибиторного потенциала.

На возможность частичного всасывания соевых ингибиторов в желудочно-кишечном тракте и их поступления в кровоток указывают работы А.Р. Кеннеди (Kennedy, 1998). Ингибитор трипсина из бобов сои, по-видимому, может преодолевать эпителиальный барьер в бóльших количествах, чем обычные пищевые белки вследствие повышенной устойчивости антигенной структуры к действию пищеварительных ферментов (Мазо, Садыкова, Саменкова, 1984). Е.А. Бородиным и соавторами (2003) показано снижение общей протеолитической активности сыворотки крови с $0,287 \pm 0,022$ до $0,226 \pm 0,019$ Е/л на фоне увеличения содержания общего белка с $71,1 \pm 1,56$ до $76,8 \pm 1,52$ г/л ($p < 0,02$) у здоровых молодых людей, принимающих соевые коктейли в течение двух недель, что согласуется с всасыванием ингибиторов трипсина из ЖКТ. Однако остается неясным, проникает ингибитор целиком, либо его отдельные части, сохраняющие ингибиторную активность. На вероятность проявления активности у частично гидролизованного ингибитора косвенно указывают данные В.В. Мосолова, Л.П. Васьковой и Л.И. Кротова (1974), выделивших из препарата ингибитора Кюнитца из бобов сои четыре компонента, из которых три обладали ингибиторной активностью. Таким образом, наши данные позволяют предполагать, что употребление активных ингибиторов в составе пищевых продуктов может оказывать влияние и на физиологические процессы, протекающие в крови, сопряженные с протеолизом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение биоинформационного исследования с помощью ряда специализированных компьютерных программ вычислительной биологии показало, что на уровне первичной структуры апротинин и соевый ингибитор трипсина являются низкоомологичными белками. Однако между отдельными участками полипептидных цепей исследуемых белков обнаружена высокая степень сходства, указывающая на однотипность первичных структур и пространственную укладку молекул. С помощью методов биоинформатики было установлено, что исследуемые белки-ингибиторы являются ингибиторами ренина, ангиотензин-превращающего и эндотелин-превращающего ферментов. Таким образом, полученные данные косвенно свидетельствуют об однотипности биологических функций апротинина и СИТ. Результаты расчетов являются статистически достоверными, но требуют подтверждения классическими методами исследования. На заключительном этапе биоинформационного исследования были построены электронные пространственные структуры ингибиторов. Данные электронные структуры создавались для исследования гомологии на уровне третичной организации белков, а также изучения белок-белковых взаимодействий с целью поиска потенциальных молекул-мишеней апротинина и СИТ в базах данных известных протеолитических энзимов человека. Для этого необходимы специализированные компьютерные программы, которых не было в свободном доступе в Интернете на момент исследования.

По результатам исследования удельной ингибиторной активности ингибиторов *in vitro* установлено, что апротинин и СИТ в одинаковой степени способны подавлять действие трипсина. Дальнейшими исследованиями, проведенными в условиях *in vitro*, подтверждена однотипность биологического действия апротинина и СИТ, затрагивающая такие важнейшие физиологические процессы как свертывание крови, фибринолиз, агрегация тромбоцитов, работа системы комплемента. Ингибиторы оказывают

однотипное замедляющее действие на свертывание крови, фибринолиз и агрегацию тромбоцитов. СИТ статистически достоверно увеличивает протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время и тромбиновое время свертывания. Апротинин повышает лишь активированное частичное тромбопластиновое время и тромбиновое время свертывания. По воздействию на тромбиновое время свертывания плазмы крови апротинин существенно уступает СИТ. Оба ингибитора значительно подавляют фибринолиз. Установлено, что трипсин оказывает противоположный ингибиторам эффект, ускоряя вышеуказанные процессы. В опытах *in vitro* выявлены антиагрегационные свойства апротинина и СИТ. Ингибиторы в равной степени статистически достоверно снижают агрегабельность тромбоцитов. Данный эффект ингибиторов обнаружен в случае обратимой, двухфазной и необратимой АДФ-инициируемой и двухфазной адреналин-инициируемой типах агрегации. Трипсин, наоборот, увеличивает агрегабельность тромбоцитов. Исследуемые ингибиторы в применяемых концентрациях не влияют на скорость и степень комплемент-зависимого лизиса эритроцитов, протекающего по классическому пути активации. Отсутствие ингибирующего действия апротинина и СИТ на работу системы комплемента может быть обусловлено специфичностью ингибиторов. Трипсин оказывает выраженное подавляющее действие на гемолитическую активность комплемента. Обнаружена зависимость скорости гемолиза от концентрации трипсина. Полученные в ходе сравнительного исследования данные позволяют рассматривать апротинин и СИТ как структурно и функционально подобные белки.

Исследование влияния изолята соевого белка, обладающего антипротеолитической активностью, показало статистически достоверное увеличение трипсин-ингибиторной активности на фоне снижения общей протеолитической активности сыворотки крови людей. Данные факты указывают на возможность воздействия ингибиторов на физиологические процессы, сопряженные с протеолизом, через желудочно-кишечный тракт.

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-инициируемой и двухфазной адреналин-инициируемой агрегации тромбоцитов.
6. Растворы СИТ и апротинина в концентрациях 0,01-1,0% не влияют на скорость и степень комплемент-зависимого гемолиза *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.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акбашева О.Е., Суханова Г.А., Щепеткин И.А. и др. Показатели протеолиза в оценке резорбции при опухолях кости // Клин. лабор. диагн. 2000. № 11. С. 23-33.
2. Андрееenko Г.В., Кудряшов Б.А. Экспериментальный тромбоз и его профилактика ингибитором трипсина // Вопр. мед. химии. 1961а. № 1. С. 70-74.
3. Андрееenko Г.В., Кудряшов Б.А. Влияние ингибитора трипсина из соевых бобов на свертывание крови // Вопр. мед. химии. 1961б. №5. С. 513-519.
4. Арчаков А.И., Иванов Д.Ю., Раченкова Н.И. и др. Исследование взаимодействия трипсина с соевым ингибитором трипсина с помощью метода оптического биосенсора // Биомед. химия. 2005. № 6. С. 617-625.
5. Басанова А.В., Баскова И.П., Завалова Л.Л. Регуляторы тромбоцитарно-сосудистого и плазменного звеньев гемостаза из кровососущих // Биохимия. 2002. Т. 67, Вып. 1. С. 167-176.
6. Белова Л.А., Оглобина О.Г., Саталкин А.А. и др. Дисбаланс протеиназно-ингибиторной системы при акушерском сепсисе и септическим шоке // Клин. лабор. диагностика. 2003. № 7. С. 13-16.
7. Бельтюков П.П., Галевская Л.В, Симкина Н.Б. и др. Состояние системы комплемента человека после протеолитической обработки *in vitro* // Вест. Моск. Университета. 2003. С. 2, Т. 44, № 1. С. 24-25.
8. Бородин Е.А., Аксенова Т.В., Анищенко Н.И. Пищевые продукты из сои. Новая роль // Вестник ДВО РАН. 2000. № 3. С. 72-85.
9. Бородин Е.А., Бородина Г.П., Штарберг М.А. и др. Исследование влияния питательных соевых коктейлей и витамина Е на биохимические показатели сыворотки крови у здоровых молодых людей // Дальневост. мед. журнал. 2003. № 3. С. 14-17.

10. Веремеенко К.Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев: «Здоров'я», 1971. 217 с.
11. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П. Протеолиз и злокачественный рост (Обзор) // Вопр. мед. химии. 1986. № 6. С. 17-25.
12. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии. Киев: «Здоров'я», 1988. 198 с.
13. Вовчук И.Л., Бендерская Н.В., Чернадчук С.С. и др. Тканевые протеиназы опухолей яичника и матки // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. 2001. Т. 14, № 2. С. 17-20.
14. Гиnodман Л.М. О механизме функционирования пептидогидролаз // Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46, № 5. С. 477.
15. Гладышева И.П., Попыкина Н.А., Замолodчикова Т.С., Ларионова Н.И. Взаимодействие дуоденазы с α 1-ингибитором протеиназ // Биохимия. 2001. Т. 66, Вып. 6. С. 839-845.
16. Гомазков О.А. Система эндотелиновых пептидов: механизмы кардио-васкулярных патологий // Вопр. мед. химии. 1999. № 4. С. 60-81.
17. Грицюк Т.Л., Кузнецова Т.А. Компоненты комплемента и иммунные комплексы у онкологических больных // Тихоокеан. мед. журнал. 2005. № 4. С. 17-19.
18. Дементьева И.И., Чарная М.А., Дземешкевич С.Л., Зюляева Т.П. Превентивная роль больших доз апротинина в снижении степени нарушений метаболизма при операциях аортокоронарного шунтирования // Анестезиология и реаниматология. 1996. № 1. С. 55-58.
19. Доценко В.Л., Нахинян Р.И., Соловьева Н.И. и др. Протеолитические ферменты слезной жидкости как факторы патогенеза хронических язв роговой оболочки глаза // Вопр. мед. химии. 1990. № 3. С. 73-76.
20. Дунаевский Я.Е., Цыбина Т.А., Белякова Г.А., Домаш В.И., Шарпио Т.П., Забрейко С.А., Белозерский М.А. Ингибиторы протеиназ как

- антистрессовые белки высших растений // Прик. биох. и микробиол. 2005. Т. 41, № 4. С. 392-396.
21. Дэвени Е., Гергей Я. В кн.: Аминокислоты, пептиды и белки. Под ред. Незлина Р.С.. Москва: «Мир», 1976. 168 с.
 22. Дюкова Е.В. Активность протеиназ и их ингибиторов при воспалительных заболеваниях кожи: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2004. 20 с.
 23. Елисеева Ю.Е. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль // Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46, № 5. С. 53-60.
 24. Ефременко Ю.Р., Конторщикова К.Н. Состояние системы протеолиза в условиях окислительных воздействий на организм // Нижегородский мед. журнал. 2003. № 1. С. 15-21.
 25. Зорин Н.А., Жабин С.Г., Козлов И.Г., Горлина Н.К. и др. Изучение Реакций между ингибиторами протеиназ плазмы крови и коллагеном // Вопр. мед. химии. 1995. Т. 41, № 6. С. 53-55.
 26. Иванов В.В., Пучков К.В. Система гемостаза при хирургическом стрессе: дискуссионные аспекты факторов тромбоопасности при лапароскопических вмешательствах // Тихоокеан. мед. журнал. 2007. № 1. С. 31-33.
 27. Кирпиченок Л.Н., Гидранович Л.Г., Шиленок В.Н. Активность протеолитических процессов при заболеваниях щитовидной железы // Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46, № 5. С. 518-519.
 28. Козлов Л.В., Крылова Ю.И., Чих В.П., Молчанова Н.Н. Модифицированные методы определения функциональной активности факторов комплемента C2, C3, C4 и C5 // Биоорг. химия. 1982. Т. 8, № 5. С. 652-659.

29. Инструкция по определению агрегационной активности тромбоцитов на анализаторе AP 2110. Минск: Издательство «Солар», 1995. 22 с.
30. Мазо В.К., Садыкова Р.Е., Саменкова Н.Ф. Переваривание ингибиторов трипсина в ЖКТ взрослых крыс // Патол. физиол. и экспер. терапия. 1984. № 5. С. 51-53.
31. Маянский Д.Н., Цырендоржиев Д.Д., Рупакова С.А. Лизосомальные ферменты фагоцитирующих клеток в патогенезе воспаления // Вопр. мед. химии. 1987. № 5. С. 48-52.
32. Мизулин Ф.Ф. «Воспаление» [Электронный ресурс]: лекция, Новосибирск, 1995. Режим доступа: <http://www.5ka/50/10594/1.html> (дата обращения 25.09.2006).
33. Михайлов И.Б. Клиническая фармакология. Санкт-Петербург: «Фолиант», изд. третье, 2002. 451 с.
34. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. Москва: Наука, 1971. 414 с.
35. Мосолов В.В., Васькова Л.П., Кротова Л.И. Влияние дезаминирования на реакцию химотрипсина с природными ингибиторами // Биохимия. 1974. Т. 39, Вып. 4. С. 725-731.
36. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (Обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 2005. Т. 41, № 3. С. 261-282.
37. Моссе Д., Пернолле Д. Химия и биохимия бобовых. Москва: Агропромиздат, 1986. 248 с.
38. Нагорная В.Ф. Роль энзимов в патогенезе опухолей гениталий // Акушерство и гинекология. 1989. № 4. С. 11-15.
39. Нартикова, В.Ф., Пасхина Т.С. Определение антитриптической активности в сыворотке крови человека // Современные методы в биохимии. Под. ред. Ореховича В.Н. Москва: Медицина, 1977. С. 188-191.
40. Никулин А.А. Никулин А.А. Препараты ферментов и коферментов, активаторы и ингибиторы ферментов. Уч. пособие. Министерство

здравоохранения РСФСР, Рязанский медицинский ин-т им. акад. И.П. Павлова. Рязань, 1989. 103 с.

41. Остапченко В.Г. Каталитическая субъединица энтеропептидазы человека: получение, характеристика ферментативных свойств и моделирование мутаций, облегчающих ренатурацию и повышающих специфичность фермента: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2006. 24 с.
42. Пашин В.С., Киридон О.А., Карабаш А.П., Родькин Д.В., Бояркин С.В., Копырин А.А. Оптимизация режима антикоагулянтной терапии у больных с тромбозом глубоких вен в условиях стационара // Тихоокеан. мед. журнал. 2007. № 3. С. 43–44.
43. Подорольская Л.В., Андреев Г.В., Полянцева Л.Р. и др. Активаторы и ингибиторы фибринолиза при хроническом гломерулонефрите и амилоидозе // Вопр. мед. химии. 1996. Т. 42, № 4. С. 322-327.
44. Потетина Ж.В., Воюшина Т.Л., Дрозд Н.Н., Макаров В.А. Пути фармакологического ингибирования активности тромбина и плазмина // Эксперим. и клин. фармакология. 2001. Т. 64, № 5. С. 72-78.
45. Пучков К.В., Иванов В.В. Эндовидеохирургия малых пространств: особенности реакции системы гемостаза // Тихоокеан. мед. журнал. 2007. № 4. С. 58-61.
46. Ротанова Т.В. Энергозависимый селективный внутриклеточный протеолиз. Строение, активные центры и специфичность АТР-зависимых протеиназ // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 47, № 1. С. 3-19.
47. Соловьева Н.И., Волкова З.И. Исследование протеолитической активности клеток крови при ревматоидном артрите // Вопр. мед. химии. 1990. Т. 36, № 3. С. 48-52.
48. Соловьева Н.И., Елисеева Ю.А., Локшина Л.А. Протеолитические ферменты и их биологические функции // Вестник Российск. Академии Наук. 1995. № 2. С. 3-9.

49. Сперанская А.С., Криницына А.А., Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Керученько Я.С., Шевелев А.Б., Валуева Т.А. Гетерологичная экспрессия, очистка и свойства белка-ингибитора сериновых протеиназ из картофеля // Биохимия. 2006. Т. 71, Вып. 11. С. 1451-1458.
50. Степанов В.М. Современные проблемы физиологии пищеварения // Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. № 1. С. 37-41.
51. Суханова Г.А., Кондратьева Е.И., Спирина Л.В. Значение калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и ингибиторов протеолиза при сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 1 у детей // Клин. лабор. диагностика. 2004. № 5. С. 38-40.
52. Сыновец А.С., Левицкий А.П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. Киев: «Здоров'я», 1985. 72 с.
53. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. Под ред. Курганова Б.И. Москва: «Мир», 1980. 432 с.
54. Цыбина Т.А., Попыкина Н.А., Ларионова Н.И., Дунаевский Я.Е., Белозерский М.А. Катионные ингибиторы сериновых протеиназ из семян гречихи: изучение взаимодействия с экзогенными ферментами // Биохимия. 2004. Т. 69, Вып. 4. С. 544-548.
55. Чарная М.А., Дементьева И.И., Использование апротинина при хирургических вмешательствах, сопряженных с высоким риском геморрагических осложнений // Хирургия. 2005. № 11. С. 71-76.
56. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. Под ред. Попова Е.М. Москва: «Мир», 1982. 358 с.
57. Щербак И.Г. Биологическая химия. Уч-к для мед. вузов. Ред. Габалевская Л.В. Изд-во СПбГМУ, 2005. 276 с.
58. Яровая Г.А. Калликреин-кининовая система: новые факты и концепции (Обзор) // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 47, № 1. С. 20-42.
59. AbuMweis S.S., Jones P.J. Cholesterol-lowering effect of plant sterols // Curr. Atheroscler Rep. 2008. Vol. 10, № 6. P. 467-472.

60. Akbasheva, O.E. Parameters of plasma blood proteolysis and phenotypes of alpha1-proteinase inhibitor in children with duodenal ulcer // Biomed. Khim. 2007. Vol. 53, № 3. P. 338-344.
61. Al-Majid S., Waters H. The biological mechanisms of cancer-related skeletal muscle wasting: the role of progressive resistance exercise // Biol. Res. Nurs. 2008. Vol. 10, № 1. P. 7-20.
62. Ambesi-Impiombato A., Bernardo D. Computational Biology and Drug Discovery: From Single-Target to Network Drugs // Curr. Bioinformatics. 2006. Vol. 1. P. 3-13.
63. Anderson J.W. Beneficial effects of soy protein consumption for renal function // Asia Pac. J. Clin. Nutr. 2008. Vol. 17, Suppl. 1. P. 324-328.
64. Arbogast H.P. Thrombin: antithrombotic properties and pharmacological consequences // Hamostaseologie. 2004. Vol. 24, № 3. P. 179-190.
65. Bas M., Adams V., Suvorava T., Niehues T., Hoffmann T.K., Kojda G. Nonallergic angioedema: role of bradykinin // Allergy. 2007. Vol. 62, № 8. P. 842-856.
66. Bashir T., Pagano M. Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis // Adv. Cancer. Res. 2003. Vol. 88. P. 101-144.
67. Beierlein W., Scheule A.M., Dietrich W., Ziemer G. Forty years of clinical aprotinin use: a review of 124 hypersensitivity reactions // Ann. Thorac. Surg. 2005. Vol. 79, № 2. P. 741-748.
68. Bent S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation: grand rounds at University of California San Francisco Medical Center // J. Gen. Intern. Med. 2008. Vol. 23, № 6. P. 854-859.
69. Bernstein I.L. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, II: historical perspective of non-histamine-induced angioedema // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2008. Vol. 100, № 1, Suppl. 2. P. S2-6.

70. Bernstein J.A. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, VIII: current status of emerging therapies // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008. Vol. 100, № 1, Suppl 2. P. S41-46.
71. Blow D., Janin J., Sweet R.M. Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein-protein interactions // *Nature.* 1974. Vol. 3, № 249. P. 52-57.
72. Blundell T.L., Bancinyane L. Sibanda K., Montalvao R.W. et al. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2006. Vol. 361. P. 413–423.
73. Borodin E.A., Shtarberg M.A., Aksyonova T.V., Beloglazova I.G. Soy foods. Biological role and use in medicine // *Studies on Drugs Used in Traditional Therapy: Book of Abstracts of China and Russia Pharmaceutical Forum.* 10-14 april 2004a, Harbin. P. 20-26.
74. Borodin E., Shtarberg M., Beloglazova I., Anikin S. Protease inhibitors from soybeans – antinutrias factors or respective drugs? // *The eleventh international symposium IV Japan-Russia medical exchanges: Book of Abstract.* 10-11 august 2004b, Niigata. Niigata: JRME. P. 75.
75. Bracho F.A. Hereditary angioedema // *Curr Opin Hematol.* 2005. Vol. 12, № 6. P. 493-508.
76. Bühling F., Groneberg D., Welte T. Proteases and their role in chronic inflammatory lung diseases // *Curr. Drug Targets.* 2006. Vol. 7, № 6. P. 751-759.
77. Butenas S., Mann K. Blood Coagulation // *Biochemistry (Moscow).* 2002. Vol. 67, № 1. P. 3-12.
78. Casterella P.J., Tcheng J.E. Review of the 2005. American College of Cardiology, American Heart Association, and Society for Cardiovascular Interventions guidelines for adjunctive pharmacologic therapy during percutaneous coronary interventions: practical implications, new clinical data,

- and recommended guideline revisions // *Am. Heart J.* 2008. Vol. 155, № 5. P. 781-790.
79. Chondrogianni N., Gonos E. Proteasome activation as a novel antiaging strategy // *IUBMB Life.* 2008. Vol. 60, № 10. P. 651-655.
 80. Cicardi M., Zingale L., Zanichelli A., Pappalardo E., Cicardi B. C1 inhibitor: molecular and clinical aspects // *Springer Semin Immunopathol.* 2005. Vol. 27, № 3. P. 286-298.
 81. Cicardi M., Zingale L.C., Zanichelli A., Deliliers D.L., Caccia S. The use of plasma-derived C1 inhibitor in the treatment of hereditary angioedema // *Expert Opin Pharmacother.* 2007. Vol. 8, № 18. P. 3173-3181.
 82. Connors J.J. 3rd. Pharmacologic agents in stroke prevention, acute stroke therapy, and interventional procedures // *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2004. Vol. 15, № 1, Pt. 2. P. S87-101.
 83. Correale M., Brunetti N.D., De Gennaro L., Di Biase M. Acute phase proteins in atherosclerosis (acute coronary syndrome) // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2008. Vol. 6, № 4. P. 272-277.
 84. Cottrell G.S., Coelho A.M., Bunnett N.W. Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signaling // *J. Essays Biochem.* 2002. V. 38. P. 169-183.
 85. Csáky I., Fekete S. Soybean: feed quality and safety. Part 1: biologically active components. A review // *Acta. Vet. Hung.* 2004. Vol. 52, № 3. P. 299-313.
 86. Davie, E.W., Fujikawa, K., Kisiel, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. 10363–10370.
 87. Davis A.E. 3rd, Cai S., Liu D. C1 inhibitor: biologic activities that are independent of protease inhibition // *Immunobiology.* 2007. Vol. 212, № 4. P. 313-323.
 88. Debigare R., Price S.R. Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases // *J. Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003. Vol. 285, № 1. P. 1-8.

89. Di Masi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs // *J. Health Econ.* 2003. Vol. 22. P. 151-185.
90. Dietrich W., Barankay A., Dilthey G., Henze R., Niekau E., Sebening F., Richter J.A. Reduction of homologous blood requirement in cardiac surgery by intraoperative aprotinin application--clinical experience in 152 cardiac surgical patients // *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1989. Vol. 37, № 2. P. 92-98.
91. Doherty F.J., Dawson S., Mayer R.J. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis // *J. Essays Biochem.* 2003. Vol. 38. P. 51-63.
92. Doucet A., Overall C.M. Protease proteomics: revealing protease in vivo functions using systems biology approaches // *Mol. Aspects Med.* 2008. Vol. 29, № 5. P. 339-358.
93. Dupont D.M., Madsen J.B., Kristensen T., Bodker J.S., Blouse G.E., Wind T., Andreasen P.A. Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1 // *Front Biosci.* 2009. Vol. 1, № 14. P. 1337-1361.
94. Edwards D.R., Handsley M.M., Pennington C.J. The ADAM metalloproteinases // *Mol. Aspects Med.* 2008. Vol. 29, № 5. P. 258-289.
95. Ekins S., Mestres J., Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond // *British Journal of Pharmacology.* 2007. Vol. 152. P. 21-37.
96. Fareed J., Iqbal O., Cunanan J., Demir M., Wahi R., Clarke M., Adiguzel C., Bick R. Chaining trends in anti-coagulant therapies. Are heparins and oral anti-coagulants challenged // *Int. Angiol.* 2008a. Vol. 27, № 3. P. 176-192.
97. Fareed J., Hoppensteadt D.A., Fareed D., Demir M., Wahi R., Clarke M., Adiguzel C., Bick R. Survival of heparins, oral anticoagulants, and aspirin after the year 2010 // *Semin Thromb Hemost.* 2008b. Vol. 34, № 1. P. 58-73.
98. Franco O.L., Dias S.C., Magalhaes C.P., Monteiro A.C., Bloch C., Melo F.R., Oliveira-Neto O.B., Monnerat R.G., Grossi-de-Sa M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) // *Phytochemistry.* 2004. Vol. 65. P. 81-89.

99. Freeman M. Rhomboid proteases and their biological functions // *Annu. Rev. Genet.* 2008. Vol. 42. P. 191-210.
100. Fritz H., Jochum M. Granulocyte proteinases as mediators of unspecific proteolysis in inflammation: a review // In: Goldberg D.M, Werner M. *Selected Topics in Clinical Enzymology 2: Walter de Gruyter, Berlin, 1984.* Vol. 2. P. 305-328.
101. Gao Z., Li H., Zhang H. et al. PDTD: a web-accessible protein database for drug target Identification // *BMC Bioinformatics.* 2008. Vol. 9. P. 104.
102. Geromichalos G.D. Importance of molecular computer modeling in anticancer drug development. *J. Buon.* 2007. Vol. 12, Suppl. 1. P. S101-118.
103. Gibbons G.H., Dzau V.J. The emerging concept of vascular remodeling // *N. Engl. J. Med.* 1994. Vol. 330, № 20. P. 1431-1438.
104. Glaumann H., Ahlberg J., Berkernstam A., Henell F. Rapid isolation of rat liver secondary lysosomes--autophagic vacuoles--following chloroquine administration // *Exp. Cell. Res.* 1986. Vol. 163. P. 151-158.
105. Hall K.D., Baracos V.E. Computational modeling of cancer cachexia // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2008. Vol. 11, № 3. P. 214-221.
106. Hanson W.M., Domek G.J., Horvath M.P., Goldenberg D.P. Rigidification of a flexible protease inhibitor variant upon binding to trypsin // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 366. P. 230-243.
107. He S.H., Chen H.Q., Zheng J. Inhibition of tryptase and chymase induced nucleated cell infiltration by proteinase inhibitor // *Acta Pharmacol Sin.* 2004. Vol. 25, № 12. P. 1677-1684.
108. Hiemstra P.S. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation // *Biochem. Soc. Trans.* 2002. Vol. 30, № 2. P. 116-120.
109. Hoppensteadt D.A., Jeske W., Walenga J., Fareed J. The future of anticoagulation // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2008. Vol. 29, № 1. P. 90-99.
110. Horwitz A.M., Li F.Q., Albani D., Duan Z., Person R.E., Meade-White K., Benson K.F. Leukemia in severe congenital neutropenia: defective proteolysis

- suggests new pathways to malignancy and opportunities for therapy // *J. Cancer Invest.* 2003. Vol. 21, № 4. P. 579-587.
111. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles // *J. Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1535, № 3. P. 221-235.
 112. Jennings L.K, Saucedo J.F. Antiplatelet and anticoagulant agents: key differences in mechanisms of action, clinical application, and therapeutic benefit in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes // *Curr. Opin. Cardiol.* 2008. Vol. 23, № 4. P. 302-308.
 113. Kadowaki M., Kanazawa T. Amino acids as regulators of proteolysis // *J. Nutr.* 2003. Vol. 133, № 6, Suppl. 1. P. 2052S-2056S.
 114. Kandzari D.E. Future perspectives on antithrombin and antiplatelet therapies: novel antiplatelet and antithrombin therapies // *Rev. Cardiovasc. Med.* 2006. Vol. 7, Suppl. 3. P. S43-52.
 115. Kennedy A.R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as anticarcinogenic agent // *Am. J. Clin. Nutr.* 1998. Vol. 68, № 6. P. 1406-1412.
 116. Khan H., Salman K., Ahmed S. Alpha-1 antitrypsin deficiency in emphysema // *J. Assoc. Physicians. India.* 2002. Vol. 50. P. 579-582.
 117. Klauss V., Spannagl M. Thrombin inhibitors and anti-factor Xa agents in the treatment of arterial occlusion // *Curr. Drug Targets.* 2006. Vol. 7, № 10. P. 1285-1290.
 118. Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y. et al. Suppression of lipopolysaccharide-induced cytokine production of gingival fibroblasts by a soybean, Kunitz trypsin inhibitor // *J. Periodontal Res.* 2005a. Vol. 40, № 6. P. 461-468.
 119. Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y. et al. A soybean Kunitz trypsin inhibitor reduces tumor necrosis factor-alpha production in ultraviolet-exposed primary human keratinocytes // *Exp. Dermatol.* 2005b. Vol. 14, № 10. P. 765-774.

120. Kobayashi H., Yoshida R., Kanada Y. et al. Dietary supplementation of soybean kunitz trypsin inhibitor reduces lipopolysaccharide-induced lethality in mouse model // Shock. 2005c. Vol. 23, № 5. P. 441-447.
121. Kockar C., Kockar O., Ozturk M., Dagli M., Bavbek N., Kosar A. Global fibrinolytic capacity increased exponentially in metastatic colorectal cancer // Clin. Appl. Thromb Hemost. 2005. Vol. 11, № 2. P. 227-230.
122. Kuchan M.J., Frangos J.A. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells // Am. J. Physiol. 1993. Vol. 264. P. 150-156.
123. Kuester D., Lippert H., Roessner A., Krueger S. The cathepsin family and their role in colorectal cancer // Pathol. Res. Pract. 2008. Vol. 204, № 7. P. 491-500.
124. Kurzer M.S. Soy consumption for reduction of menopausal symptoms // Inflammopharmacology. 2008. Vol. 16, № 5. P. 227-229.
125. Lambert L.A., Whyteside A.R., Turner A.J., Usmani B.A. Isoforms of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) have opposing effects on prostate cancer cell invasion // Br. J. Cancer. 2008. Vol. 99. P. 1114-1120.
126. Lancaster L.H., Christman J.W., Blackwell T.R., Koay M.A., Blackwell T.S. Suppression of lung inflammation in rats by prevention of NF-kappaB activation in the liver // Inflammation. 2001. Vol. 25, № 1. P. 25-31.
127. Law R., Zhang Q., McGowan S., Buckle A., Silverman G., Wong W., Rosado C., Langendorf C., Pike R., Bird B. and Whisstock J. An overview of the serpin superfamily // Genome Biology. 2006. Vol. 7, I. 5, A. 216. P. 1-11.
128. Lehman S.J., Chew D.P. Bivalirudin in percutaneous coronary intervention // Vasc. Health Risk Manag. 2006. Vol. 2, № 4. P. 357-363.
129. Lepor N.E. Anticoagulation for acute coronary syndromes: from heparin to direct thrombin inhibitors // Rev. Cardiovasc. Med. 2007. Vol. 8, Suppl. 3. P. S9-17.
130. Levin E.R. Endothelins // N. Engl. J. Med. 1995. Vol. 333. № 6. P. 356-363.

131. Li Q., Lai L. Prediction of potential drug targets based on simple sequence Properties // BMC Bioinformatics. 2007. Vol 8. P. 353-364.
132. Li W., Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms // Cell Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65, № 15. P. 2397-2406.
133. Lindstedt K.A., Leskinen M.J., Kovanen P.T. Proteolysis of the Pericellular Matrix. A Novel Element Determining Cell Survival and Death in the Pathogenesis of Plaque Erosion and Rupture // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 2004. Vol. 24. P. 1350-1358.
134. Lucas A., McFadden G. Secreted immunomodulatory viral proteins as novel biotherapeutics // J. Immunol. 2004. Vol. 173, № 8. P. 4765-4774.
135. Losso J.N. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2008. Vol. 48, № 1. P. 94-118.
136. Maignan S., Mikol V. The use of 3D structural data in the design of specific factor Xa inhibitor // J. Curr. Top Med. Chem. 2001. Vol. 1, № 2. P. 161-174.
137. Marfany G., Farràs R., Salido E., Xirodimas D.P., Rodríguez M.S. Much to know about proteolysis: intricate proteolytic machineries compromise essential cellular functions // Biochem. Soc. Trans. 2008. Vol. 36, Pt. 5. P. 781-785.
138. Meta A., Nakatake H., Imamura T., Nozaki C. High-yield production and characterization of biologically active recombinant aprotinin expressed in *Saccharomyces cerevisiae* [Электронный ресурс]: Protein Expr. Purif, 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 10.01.2009).
139. Moreau M.E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N.J., Marceau F., Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets // J. Pharmacol. Sci. 2005. Vol. 99, № 1. P. 6-38.
140. Moser M., Bode C. Anticoagulation in acute coronary syndrome. An update // Hamostaseologie. 2008. Vol. 28, № 1. P. 62-65.

141. Moța M., Gârgavu S., Popa S., Schiopu S., Panduru N.M., Moța E. Soya - the medicine food product // Rom. J. Intern. Med. 2007. Vol. 45, № 1. P. 113-121.
142. Muszyńska A., Janocha E., Fal A.M. Hereditary angioedema – pathophysiology, genetics, symptoms // Pol. Merkur. Lekarski. 2008. Vol. 25, № 145. P. 90-93.
143. Nepomniashchikh T.S., Shchelkunov S.N. Poxviral immunomodulatory proteins as new therapeutics for immunocorrection // Mol. Biol. 2008. Vol. 42, № 5. P. 904-912.
144. Nettis E., Colanardi M.C., Loria M.P., Vacca A. Acquired C1-inhibitor deficiency in a patient with systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature // Eur. J. Clin. Invest. 2005. Vol. 35, № 12. P. 781-784.
145. Nichols L., Lagana S., Parwani A. Coronary artery aneurysm: a review and hypothesis regarding etiology // Arch. Pathol. Lab. Med. 2008. Vol. 132, № 5. P. 823-828.
146. Nutescu E.A., Shapiro N.L., Chevalier A. New anticoagulant agents: direct thrombin inhibitors // Clin. Geriatr. Med. 2006. Vol. 22, № 1. P. 33-56, viii.
147. Nutescu E.A., Shapiro N.L., Chevalier A. New anticoagulant agents: direct thrombin inhibitors // Cardiol. Clin. 2008. Vol. 26, № 2. P. 169-187, v-vi.
148. Oliviero C. Rapid Methods for Comparing Protein Structures and Scanning Structure Databases // Current Bioinformatics. 2006. Vol. 1. P. 75-83.
149. Pazos F., Bang J.-W. Computational Prediction of Functionally Important Regions in Protein // Current Bioinformatics. 2006. Vol. 1. P. 15-23.
150. Pengo V. New trends in anticoagulant treatments // Lupus. 2005. Vol. 14, № 9. P. 789-793.
151. Perona J.J., Craik C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases // Protein Science. 1999. Vol. 4, № 3. P. 337-360.
152. Peters J.M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond // J. Mol. Cell. Molecular Cell. Vol. 9., № 5. P. 931-943.

153. Pierre-Paul P., Benoit A., Boudjeltia K.Z. et al. Anti-hemostatic Effects of a Serpin from the Saliva of the Tick *Ixodes ricinus* // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 36. P. 26361–26369.
154. Voet D., Voet G. *Biochemistry. Solutions Manual.* John Wiley & Sons, Inc. 1995.
155. Pontremoli S., Melloni E. Extralysosomal protein degradation // *Ann Rev. Biochem.* 1986. Vol. 55. P. 455-481.
156. Prechel M., Walenga J.M. The laboratory diagnosis and clinical management of patients with heparin-induced thrombocytopenia: an update // *Semin. Thromb Hemost.* 2008. Vol. 34, № 1. P. 86-96.
157. Puente X.S., Lopez-Otin C.A. Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors // *Genome Res.* 2004. Vol. 14. P. 609-622.
158. Radović N., Cucić S., Altarac S. Molecular aspects of apoptosis // *Acta Med. Croatica.* 2008. Vol. 62, № 3. P. 249-256.
159. Rashed N.A., Macdonald M.H., Matthews B.F. Protease inhibitor expression in soybean roots exhibiting susceptible and resistant interactions with soybean cyst nematode // *J. Nematol.* 2008. Vol. 40, № 2. P. 138-146.
160. Rawson R.B. Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus // *J. Essays Biochem.* 2002. Vol. 38, P. 155-168.
161. Redini F., Lafuma C., Horneberk W., Choay J, Robert L. Influence of heparin fragments on the biological activities of elastase(s) and alpha 1 proteinase inhibitor // *Biochem. Pharmacol.* 1988. Vol. 37. P. 4257-4261.
162. Rementeria A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco A.B., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence // *Rev. Iberoam. Micol.* 2005. Vol. 22, № 1. P. 1-23.
163. Retelny V.S., Neuendorf A., Roth J.L. Nutrition protocols for the prevention of cardiovascular disease // *Nutr. Clin. Pract.* 2008. Vol. 23, № 5. P. 468-476.
164. Ribeiro-Oliveira A.Jr., Nogueira A.I., Pereira R.M., Boas W.W., Dos Santos R.A., Simões e Silva A.C. The renin-angiotensin system and diabetes: an update // *Vasc. Health. Risk Manag.* 2008. Vol. 4, № 4. P. 787-803.

165. Ricagno S., Caccia S., Sorrentino G., Antonini G., Bolognesi M. Human Neuroserpin: Structure and Time-Dependent Inhibition [Электронный ресурс]: J. Mol. Biol., 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 10.01.2009).
166. Richardson J., Viswanathan K., Lucas A. Serpins, the vasculature, and viral therapeutics // Front. Biosci. 2006. Vol. 1, № 11. P. 1042-1056.
167. Rooijackers S.H., van Strijp J.A. Bacterial complement evasion // Mol. Immunol. 2007. Vol. 44, № 1. P. 23-32.
168. Rothman M.T. Drug insight: bleeding after percutaneous coronary intervention-risks, measures and impact of anticoagulant treatment options // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2005. Vol. 2, № 9. P. 465-474.
169. Rubin H. Serine protease inhibitors (SERPINS): where mechanism meets medicine // Nat. Med. 1996. Vol. 2. P. 632-633.
170. Rudkowska I. Functional foods for cardiovascular disease in women // Menopause Int. 2008. Vol. 14, № 2. P. 63-69.
171. Sagili R.R., Pankiw T., Zhu-Salzman K. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.) // J. Insect. Physiol. 2005. Vol. 51. P. 953-957.
172. Sakai T., Kogiso M. Soy isoflavones and immunity // J. Med. Invest. 2008. Vol. 55, № 3. P. 167-173.
173. Salvesen G.S., Riedl S.J. Caspase mechanisms // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. Vol. 615. P. 13-23.
174. Santos M.M., Moreira R. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors // Mini Rev. Med. Chem. 2007. Vol. 7, № 10. P. 1040-1050.
175. Seiki M., Yana I. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis // Cancer Sci. 2003. Vol. 94, № 7. P. 569-574.
176. Shetty S., Padijnayayveetil J., Tucker T., Stankowska D., Idell S. The fibrinolytic system and the regulation of lung epithelial cell proteolysis,

- signaling, and cellular viability // *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2008. Vol. 295, № 6. P. L967-975.
177. Schulz H., Dale G.E., Karimi-Nejad Y., Oefner C. Structure of human endothelin-converting enzyme I complexed with phosphoramidon // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 385. P. 178-187.
 178. Sigma. Catalog reagents and labware. Sigma-Aldrich, Inc. 2006. 1440 p.
 179. Silveira N.J.F., Bonalumi C.E., Arcuri H.A., Azevedo Junior W.F. Molecular Modeling Databases: A New Way in the Search of Protein Targets for Drug Development // *Current Bioinformatics.* 2007. Vol. 2. P. 1-10.
 180. Silverman G.A., Bird P.I., Robin W.C. et al. The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 36. P. 33293–33296.
 181. Silverman G.A., Whisstock J.C., Askew D.J., Pak S.C., Luke C.J., Cataltepe S., Irving J.A., Bird P.I. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis // *Cell Mol. Life Sci.* 2004. Vol. 61, № 3. P. 301-325.
 182. Sim R.B., Tsiftoglou S.A. Proteases of the complement system // *Biochem. Soc. Trans.* 2004. Vol. 32, Pt. 1. P. 21-27.
 183. Skórko-Glonek J., Sobiecka-Szkatuła A. The extracytoplasmic protein quality control in bacterium *Escherichia coli*; the role of proteases and the folding factors // *Postepy Biochem.* 2008. Vol. 54, № 3. P. 317-326.
 184. Smith M., Kocher H.M., Hunt B.J. Aprotinin in severe acute pancreatitis [Электронный ресурс]: *Int. J. Clin. Pract.*, 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 8.01.2009).
 185. Søreide, K. Proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) in gastrointestinal and pancreatic pathophysiology, inflammation and neoplasia // *Scand. J. Gastroenterol.* 2008. Vol. 43, № 8. P. 902-909.
 186. Steinbuch M. Regulation of proteinase activity. In: *Biological Functions of Proteinases.* 30 Collog. Mosback-Badenl, 1979. 270 p.

187. Steinbuch M. Regulation of protease activity // *Advanc. exp. Med. Biol.* 1984. Vol. 167. P. 421-440.
188. Sun Z., Lu W., Jiang A., Chen J., Tang F., Liu J.N. Expression, purification and characterization of aprotinin and a human analogue of aprotinin [Электронный ресурс]: *Protein Expr. Purif.*, 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 8.01.2009).
189. Suzuki K. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis // *J. Thromb Haemost.* 2008. Vol. 6, № 12. P. 2017-2026.
190. Tanaka K. The protein-destroying machinery // *Gan To Kagaku Ryoho.* 2008. Vol. 35, № 1. P. 6-10.
191. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2009. Vol. 85, № 1. P. 12-36.
192. Tans G., Janssen-Claessen T., Rosing J., Griffin J. Studies on the effect of serine protease inhibitors on activated contact factors. Application in amidolytic assays for factor XIIa, plasma kallikrein and factor XIa // *Europ. J. Biochem.* 1987. Vol. 164, № 3. P. 637-642.
193. Takeda-Shitaka M., Takaya D., Chiba C. et al. Protein structure prediction in structure based drug design // *Curr. Med. Chem.* 2004. Vol. 11, № 5. P. 551-558.
194. Tirado-Conde G., Lara B., Miravitlles M. Augmentation therapy for emphysema due to alpha-1-antitrypsin deficiency // *Ther. Adv. Respir Dis.* 2008. Vol. 2, № 1. P. 13-21.
195. Urban S., Shi Y. Core principles of intramembrane proteolysis: comparison of rhomboid and site-2 family proteases // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. Vol. 18, № 4. P. 432-441.
196. Velasquez M.T., Bhathena S.J. Role of dietary soy protein in obesity // *Int. J. Med. Sci.* 2007. Vol. 26, № 4. P. 72-82.
197. Villoutreix B.O., Renault N., Lagorce D. et al. Free resources to assist structure-based virtual ligand screening experiments // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2007. Vol. 8, № 4. P. 381-411.

198. Wagenaar-Bos I.G., Hack C.E. Structure and function of C1-inhibitor // Immunol. Allergy Clin. North Am. 2006. Vol. 26, № 4. P. 615-632.
199. Wang K.J., Takahata Y., Kono Y., Kaizuma N. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*) // Theor. Appl. Genet. 2008. Vol. 117. P. 565-573.
200. Warkentin T.E., Greinacher A., Koster A. Bivalirudin // Thromb Haemost. 2008. Vol. 99, № 5. P. 830-839.
201. Wiedow O., Meyer-Hoffert U. Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation // J. Intern. Med. 2005. Vol. 257, № 4. P. 319-328.
202. Wouters D., Wagenaar-Bos I., van Ham M., Zeerleder S. C1 inhibitor: just a serine protease inhibitor? New and old considerations on therapeutic applications of C1 inhibitor // Expert. Opin. Biol. Ther. 2008. Vol. 8, № 8. P. 1225-1240.
203. Xiang Z. Advances in Homology Protein Structure Modeling // Curr Protein Pept. Sci. 2006. Vol. 7, № 3. P. 217-227.
204. Xiao C.W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans // J. Nutr. 2008. Vol. 138, № 6. P. 1244S-1249S.
205. Yang L., Dong W., He J., Ren X., Yan W. Expression and purification of natural N-terminal recombinant bovine pancreatic trypsin inhibitor from *Pichia pastoris* // Biol. Pharm. Bull. 2008. Vol. 31. P. 1680-1685.
206. Zavasnik-Bergant T. Cystatin protease inhibitors and immune functions // Front. Biosci. 2008. Vol. 1, № 13. P. 4625-4637.
207. Zhong Q., Xu L., Zhang C., Glatz C.E. Purification of recombinant aprotinin from transgenic corn germ fraction using ion exchange and hydrophobic interaction chromatography // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 76. P. 607-613.
208. Zorio E., Gilabert-Estellés J., España F., Ramón L.A., Cosín R., Estellés A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms // Curr. Med. Chem. 2008. Vol. 15, № 9. P. 923-929.

209. Zuraw B.L., Christiansen S.C. New promise and hope for treating hereditary angioedema // Expert Opin. Investig Drugs. 2008. Vol. 17, № 5. P. 697-706.