

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛИЗА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЮ	5
1.1. Система протеолиза организма в норме и патологии	5
1.2. Протеолитические ферменты крови и ткани	8
1.3. Природа и механизм действия сериновых протеаз	13
1.4. Сериновые протеазы и протеолитические системы организма.....	16
Глава 2. ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕАЗ – РЕГУЛЯТОРЫ ПРОТЕОЛИЗА	25
2.1. Роль ингибиторов протеаз в регуляции протеолиза	25
2.2. Серпины – ингибиторы сериновых протеаз	27
2.3. Апротинин – поливалентный ингибитор протеаз.....	33
2.4. Соевый ингибитор протеаз типа Боумана-Бирка.....	39
2.5. Соевый ингибитор трипсина типа Кюнитца	42
Глава 3. СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ АПРОТИНИНА И СОЕВОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ.....	49
3.1. Сравнение апротинина и соевого ингибитора <i>in silico</i>	49
3.2. Трипсин-ингибиторная активность апротинина и соевого ингибитора <i>in vitro</i>	56
3.3. Влияние апротинина и соевого ингибитора на систему гемостаза <i>in vitro</i> ..	57
3.4. Влияние апротинина и соевого ингибитора на систему комплемента <i>in vitro</i>	67
3.5. Влияние приема изолята соевого белка на показатели протеолиза в сыворотке крови человека	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	73
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	77
ПРИЛОЖЕНИЯ	95

ВВЕДЕНИЕ

Протеолиз представляет собой гидролиз пептидных связей, протекающий под действием протеаз. Путем протеолиза активируются ферменты, гормоны, биологически активные пептиды. Организм человека содержит более пятисот протеаз (Puente X.S. et al., 2004). Типичными представителями протеаз являются трипсин, калликреин, тромбин, плазмин, урокиназа, пепсин. В регуляции действия этих протеолитических ферментов участвуют белки-ингибиторы. К таким ингибиторам, в организме человека, относятся α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин, С1-ингибитор (Jančiauskiene, 2001).

Протеазы и их ингибиторы образуют важные протеазно-ингибиторные системы, например, систему свертывания крови и фибринолиза, калликреин-кининовую, ренин-ангиотензиновую и другие системы. При патологии протеазно-ингибиторный баланс значительно смещается в сторону увеличения активности протеаз. Чрезмерная активация протеолиза представляет один из наиболее общих молекулярных механизмов повреждения тканей в условиях патологии, в частности, является важнейшим биохимическим механизмом развития фундаментального патологического процесса – воспаления (Lindstedt K.A. et al., 2004). Воспаление, протекающее с массовым выделением протеаз, сопутствует таким заболеваниям как язвы, альвеолиты, эмфизема, аневризмы, артриты (Lancaster L.H. et al., 2005; Akbasheva O.E., 2007; Santos M.M. et al., 2007; Nichols L. et al., 2008) и другие. С помощью протеолиза патогенные простейшие разрушают клетки, в которых паразитируют (Rementeria A. et al., 2005). Сегодня протеазы рассматривают, как один из факторов канцерогенеза (Bashir T. et al., 2003; Doherty F.J. et al., 2003; Søreide K., 2008). Поэтому регулирование протеолиза в условиях патологии является актуальной проблемой в клинике.

Среди фармацевтических препаратов – ингибиторов протеолитических ферментов, наиболее востребован в клинике апротинин – поливалентный ингибитор трипсина, выделяемый из органов (легкие, поджелудочная железа) крупного рогатого скота. Апротинин является полипептидом, состоящим из 58 остатков аминокислотных остатков. Препараты апротинина выпускаются рядом зарубежных фирм под различными торговыми названиями, наиболее известны из которых «Контрикал», «Трасилол», «Гордокс», и используются в клинике при профилактике и лечении острого панкреатита, панкреонекроза, кровотечений, сопряженных с гиперфибринолизом, шока и жировой эмболии. Препарат также применяется как компонент реагентов для культуры клеток, биотехнологических производств и диагностикумов для предупреждения протеолитического повреждения белков.

Как фармацевтический препарат апротинин обладает рядом существенных недостатков: возможность развития аллергических осложнений вплоть до анафилактического шока; вероятность одновременного внесения в организм инфекционного начала, характерная для всех белковых препаратов, выделяемых из тканей животных; высокая цена, обусловленная технологией его производства (Hanson W.M. et al., 2007; Zhong Q. et al., 2007; Yang L. et al., 2008; Meta A. et al., 2009; Smith M. et al., 2009; Sun Z. et al., 2009). Поэтому представляет интерес разработка аналогов апротинина, лишенных указанных недостатков. Один из подходов к решению этой задачи состоит в исследовании возможности использования для регуляции протеолиза ингибиторов протеаз растительного происхождения.

Глава 1. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛИЗА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЮ

1.1. Система протеолиза организма в норме и патологии

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 G. et al., 2008), однако его роль в организме очень разнообразна. Протеолиз вовлечен во множество физиологических реакций от простого переваривания белков пищи до очень сложных четко отрегулированных ферментативных каскадов. Урбан (Urban S. et al., 2008) называет протеолиз древним механизмом, который развился, чтобы управлять мириадами клеточных процессов во всех формах жизни. Протеолиз тесно связан с функционированием систем клеточного гомеостаза (Chondrogianni N. et al., 2008; Skórko-Glonek J. et al., 2008), течением ангиогенеза (Seiki M. et al., 2003) и гемопоеза (Horwitz A.M. et al., 2003), с ключевыми моментами митотического деления клетки (Peters J.M., 2002) и трансляции ДНК (Li W. et al., 2008), со старением организма (Chondrogianni N. et al., 2008) и апоптозом (Lindstedt K.A. et al., 2004; Radović N. et al., 2008; Salvesen G.S. et al., 2008), с процессами системы гемостаза, воспаления, боли, заживления (Cottrell G.S. et al., 2002) и так далее. В женском организме протеолиз обеспечивает протекание специфических процессов – овуляции и регрессии желтого тела (Нагорная В.Ф., 1989). Благодаря протеолизу клетки передают информацию из эндоплазматического ретикулума ядру (Rawson R.B., 2002). Кроме регуляции множества клеточных процессов, протеолиз, устраняет чужеродные белки и обеспечивает аминокислотами клетки (Debigare R. et al., 2003).

Систему протеолиза образуют вне- и внутриклеточные высокоспецифичные протеолитические ферменты – протеазы (протеиназы,

пептидазы), из разных классов. Протеазы могут быть локализованы вне клеток, на их поверхности, а также внутри клеток в пределах специфических субклеточных структур (Bühling F. et al., 2006). Основное количество протеолитических ферментов находится в лизосомах. Тем не менее, считается, что белковое разложение преимущественно осуществляется протеасомами (Chondrogianni N. et al., 2008), представляющие собой очень сложные комплексные протеазы, предназначенные для проведения эффективного, постепенного и избирательного гидролиза протеиновых субстратов (Tanaka K., 2009).

Показателями биохимизма протеолиза в организме являются соотношения протеаз и их ингибиторов. Местное равновесие между ингибиторами протеаз и протеазами определяет местную протеолитическую активность (Niemstra P.S., 2002). В норме протеазы и ингибиторы представляют хорошо сбалансированную систему. В условиях патологии протеазно-ингибиторный баланс сдвигается в сторону увеличения активности протеолитических ферментов, однако активность отдельных протеиназ может и уменьшаться (Белова Л.А. и соавт., 2003). При одном физиологическом состоянии соотношения протеаз и ингибиторов в разных тканях и жидкостях могут отличаться. Например, 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 Е.В., 2004). Для характеристики биохимизма протеолиза используют протеазно-ингибиторные индексы, показывающие отношение активных протеаз к их активным ингибиторам. Например, к наиболее интегративным показателям фибринолиза при почечных заболеваниях, сопровождающихся нефротическим синдромом, относят функциональную активность тканевого активатора плазминогена, урокиназы, плазмина и других протеаз, и их взаимодействий с ингибиторами: α_2 -антиплазмином (α_2 -АП), α_2 -МГ, α_1 -АТ, антитромбином III (Подорольская Л.В. и соавт., 1996).

Протеолиз можно считать одним из механизмов биологической регуляции метаболизма протекающей на молекулярном, клеточном и органном уровнях. Роль протеаз здесь заключается в осуществлении протеолиза двух типов: полного и ограниченного. Путем полного протеолиза происходит деградация и расщепление белков. Множественность субстратов белковой природы требует большого количества протеиназ. Так, для завершения полного гидролиза коротких пептидов – конечную стадию протеолиза – необходимы карбокси- и аминопептидазы, ди- и трипептидазы, всего около трех десятков пептидаз различной специфичности (Степанов В.М., 1998). Несмотря на огромный ряд протеолитических ферментов организма, лишь некоторые протеолитические системы содействуют полному гидролизу белков до аминокислот (Kadowaki M. et al., 2003). Путем ограниченного протеолиза происходит активация, инактивация и модификация гормонов, ферментов, биологически активных пептидов. Реакции данного протеолиза лежат в основе функционирования таких важнейших физиологических систем как ренин-ангиотензиновая, калликреин-кининовая, иммунитет, гемостаз, комплемент и других. Таким образом, протеолиз в организме выполняет деструктивную и регуляторную функции.

Протеолитический распад имеет место не только в нормальных физиологических процессах, но и сопутствует патогенезу. Известно, что протеолиз при воспалении протекает на уровне альтеративно-дистрофических реакций, сопровождающихся повышением протеолитической активности на фоне развивающегося ацидоза и снижением уровня ингибиторов протеаз, в связи, с чем ускоряется расщепление белков, в том числе токсических, и в очаге воспаления накапливается большое количество полипептидов и аминокислот (Мизулин Ф.Ф., 1995). При развитии любого воспаления интерстициальная ткань наводняется освобождающимися лизосомальными ферментами и бактериальными протеазами (Чилингилов Р.Х., 1997). В воспалительном процессе участвуют протеазы разных типов. Установлено, что в зоне воспаления накапливаются сериновые (He S.H. et al., 2004; Wiedow O. et al.,

2005) и металлосодержащие протеазы (Doherty F.J. et al., 2003). Протеолиз вовлечен в многочисленные заболевания, связанные с воспалением, включая нейродегенеративные болезни и рак (Bashir T. et al., 2003; Doherty F.J. et al., 2003). Развитие опухоли сопровождается высоким уровнем протеолиза (Вовчук И.Л. и соавт., 2001; Al-Majid S. et al., 2008). Например, при раке щитовидной железы значительно увеличивается активность сериновых (в 4-6 раз) и цистеиновых (в 6-8 раз) протеаз (Кирпиченок Л.Н. и соавт., 2000). В протекании канцерогенеза установлено участие всех типов протеаз (Дилакян Э.А. и соавт., 1994), под действием которых усиливается пролиферация, инвазия, метастазирование клеток опухоли (Чилингиров Р.Х., 1997; Søreide K., 2008). Неконтролируемое массивное выделение протеаз в кровь и ткани характерно и для многих других заболеваний, таких как язвы (Akbasheva O.E., 2007), эмфизема легких, артриты, болезнь Альцгеймера (Santos M.M. et al., 2007), пневмосклероз (Tanaka K., 2008), аневризмы (Nichols L. et al., 2008), альвеолиты (Lancaster L.H. et al., 2005) и другие. Чрезмерной активации процессов протеолиза могут способствовать активация условия окислительного воздействия на организм (Ефременко Ю.Р. и соавт., 2003), микробные инфекции (Rementeria A. et al., 2005).

Исследования функций и роли протеолитических ферментов в регуляции гомеостаза и развитии болезней продолжают и сегодня (Doucet A. et al., 2008). Очевидно, что проблема регулирования процессов протеолиза является актуальной для современной клинической медицины.

1.2. Протеолитические ферменты крови и ткани

В основе классификации протеаз лежит строение активного (каталитического) центра (Bühling F. et al., 2006). Протеазы со сходными по структуре каталитическими центрами объединяют в классы, хотя пространственная структура ферментов одного класса нередко оказывается очень разной (Степанов В.М., 1998). Выявив специфические ингибиторы для

протеазы можно отнести ее к одному из классов. Сегодня ИЮПАК (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>) выделяет около 20 подподклассов протеолитических ферментов на основе катализируемой химической реакции. В тоже время база пептидаз MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) выделяет девять кланов протеаз на основе аналогии третичной структуры или по расположению остатков каталитического центра в полипептидной цепи и часто общим мотивам последовательности вокруг каталитических остатков. Здесь же приводится классификация по каталитическому типу (аспарагиновые; цистеиновые; глутаминовые; лиазные аспарагиновые пептидазы; металлопротеазы; сериновые; смешанные; треониновые; неизвестный тип) и семействам. Семейство представляет собой набор гомологичных протеолитических ферментов (значительное сходство в аминокислотной последовательности, либо типа фермента). Приведем краткое описание классов, представители семейств которых обнаружены у человека.

Класс аспарагиновых протеаз (ASPARTIC PEPTIDASES) представлен эндопептидазами распределенных на 16 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. Аналогичную пепсину функцию выполняют ферменты желудочного сока гастриксин и химозин. Ренин основной активатор ренин-ангитензиновой системы. Пресенилины – семейство трансмембранных белков, составляющих часть протеазного комплекса γ -секретазы (мутации пресенилинов связаны с болезнью Альцгеймера). Другие, не менее известные представители аспарагиновых протеаз, белки катепсины D и E, участвуют в регуляции клеточных функций (Kuester D. et al., 2008).

Класс цистеиновых протеаз (CYSTEINE PEPTIDASES, они же тиоловые, или сульфгидрильные протеазы) насчитывает около 60 семейств. В основном это эндопептидазы. Катепсины, наиболее характерные протеазы этого класса,

встречающиеся в организме человека. Катепсины В, С, F, H, L, K, O, S, V, W, и X выполняют внутри- и внеклеточные функции (Kuester D. et al., 2008). Важную биологическую роль принадлежит убиквитин-С-концевым гидролазам, убиквитин-специфическим пептидазам, CylD протинам, отубаинам, которые влияют на систему убиквитирования/деубиквитирования белков и пептидов, аутофагинам, участвующих в процессе аутофагии.

Металлосодержащие протеазы (METALLO PEPTIDASES) включают 63 семейства. Из них в организме человека найдены в основном представители семейства аминопептидаз, имеющих важное значение для инактивации в почках энкефалинов, нейропептидов, интерлейкинов, а также способствующих протеолизу в тонкой кишке. Пептидил-дипептидазы регулируют кровяное давление через ангиотензин. Семейство матриксинов участвуют в деградации матричных белков соединительной ткани. Среди металлопротеаз имеется ряд трансмембранных белков, играющих важную роль в регуляции фенотипа клетки (Edwards D.R. et al., 2008).

Класс треониновых протеаз (THREONINE PEPTIDASES) состоит из 5 семейств. Семейства представлены терминальными и самопревращающимися гидролазами. Наследственный дефицит некоторых протеаз данного класса лежит в основе лизосомальных болезней.

Класс сериновых протеаз (SERINE PEPTIDASES) включает около 55 семейств, представители которых являются участниками многих протеолитических систем организма (см. ниже). Сериновые протеазы участвуют в протеолитическом регулировании гемопоеза (Horwitz A.M. et al., 2003). Ферменты семейства каспаз находятся в большинстве клеток животных, и составляют основную часть среди протеаз, которые являются факторами апоптоза (Salvesen G.S. et al., 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 M., 2008). Среди

сериновых протеаз наиболее типичными и известными представителями являются трипсин, химотрипсин, энтеропептидаза, урокиназа, эластаза, калликреины плазмы и крови, некоторые факторы свертывания крови. Трипсин и химотрипсин содержатся в секрете поджелудочной железы человека и участвуют в расщеплении белков пищи в тонком кишечнике. Энтеропептидаза – пищеварительный фермент, превращает трипсиноген в трипсин, а также гидролизует белки пищи. Урокиназа вырабатывается почками и участвует в растворении тромбов крови, через активацию плазмина. Эластаза – это фермент поджелудочной железы способный расщеплять эластин соединительной ткани. Калликреины являются протеазами плазмы крови и тканей и катализируют реакцию отщепления физиологически активных кининов от кининогена. В систему свертывания крови и фибринолиза входит ряд представителей сериновых протеаз (активаторы плазминогена, плазмин, тромбин, фактор X и другие).

В систему протеолиза организма человека входит большое количество разнообразных протеолитических ферментов из разных классов. Установлено, что геном человека кодирует 561 протеазу (табл. 1), составляющих так называемую «деградому» (Puente X.S. et al., 2004).

Таблица 1

Распределение протеаз в геномах крысы, мыши и человека (Puente et al., 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

П р и м е ч а н и е. Asp – аспарагиновые, Cys – цистеиновые, Metallo – металлосодержащие, Ser – сериновые, Thr – треониновые.

Основную часть протеолитических ферментов человеческого организма составляют металлосодержащие и сериновые протеазы. Количественное соотношение классов протеаз в организме человека изображено на рис. 1.

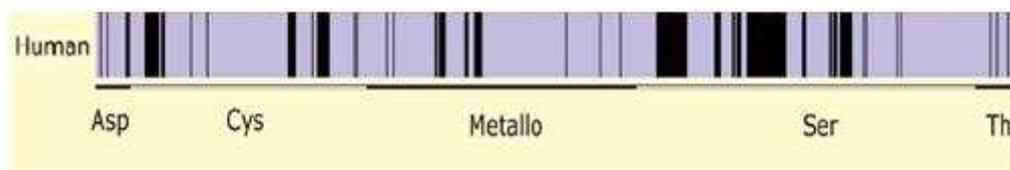


Рис. 1. Соотношение протеаз разных классов у человека (Puente X.S. et al., 2004):

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

Последние данные показывают, что из 4 основных семейств пептидаз различных классов значительно преобладают трипсиноподобные пептидазы семейства S1 (рис .2).

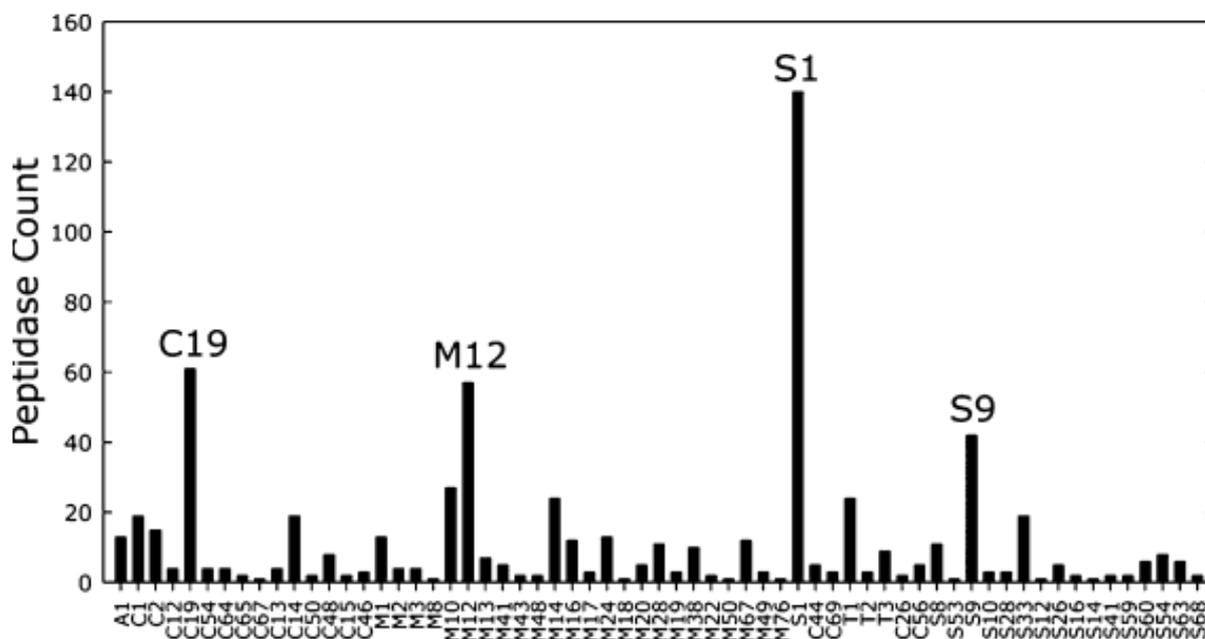


Рис. 2. Соотношение разных семейств протеаз деградомы человека (Page, Di Cera, 2008).

Расшифровку кодов семейств ферментов можно посмотреть на сайте базы Merops (<http://merops.sanger.ac.uk>).

В предыдущем параграфе уже говорилось о том, что в условиях патологии работа протеолитических ферментов организма нарушается. Протеазы становятся чрезмерно активными, а их работа не контролируется, что способствует развитию болезни. Поэтому регулирование активности протеолитических ферментов в организме имеет важное терапевтическое значение.

1.3. Природа и механизм действия сериновых протеаз

Сериновые 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. 3), который называется «сериновый сайт» (Фершт Э., 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 J. et al., 1999). Тем не менее, строение активного центра других сериновых протеаз достаточно разнообразно, однако все содержат серин (Asp, His, Ser – субтилизин; Ser, Asp, His – пролил олигопептидаза; Ser, Lys - D-Ala–D-Ala карбоксипептидаза; Ser, Lys/His – LexA пептидаза; His, Ser, His – ассемблин цитомегаловируса; Ser, Lys – большая пептидаза; Ser, His, Asp – Clp пептидаза; His, Ser – нуклеопорин; Ser – DmpA аминопептидаза; Lys, Ser – лактоферрин; Ser, Glu, His - L,D-карбоксипептидаза; His, Ser - ромбоид).

Сериновые 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.

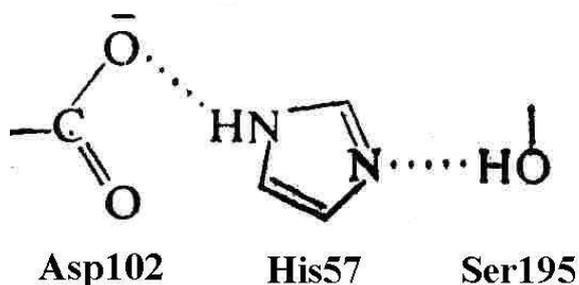


Рис. 3. Активный (каталитический) центр сериновых протеаз (Фершт Э., 1980):

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. 4).

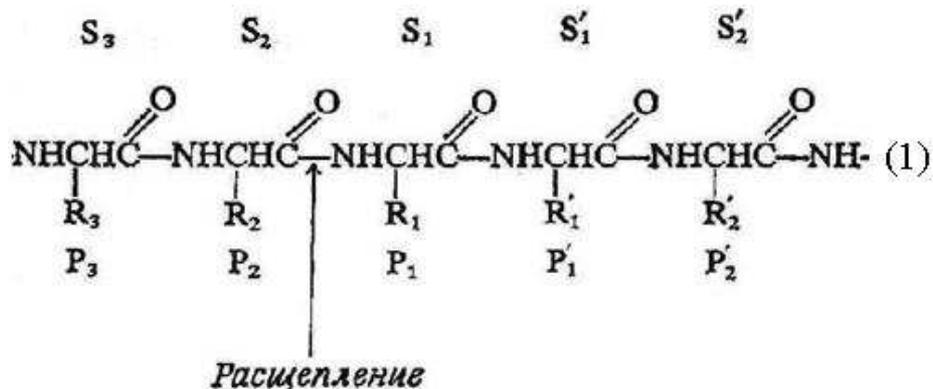


Рис. 4. Центр связывания сериновых протеаз (Фершт Э., 1980):

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

Первичный подцентр S_1 – это четко выраженная впадина, или «карман», связывающий ароматические боковые цепи субстратов, остальные подцентры представляют собой небольшие желобки и выемки (Фершт Э., 1980).

Сериновые протеазы функционируют по механизму нуклеофильного катализа (Гинодман Л.М., 2000). Выделяют три стадии гидролиза (рис. 5) белковых субстратов: а) контролируемая диффузия – образование с высокой скоростью нековалентного комплекса E*S (E – фермент, S – субстрат);

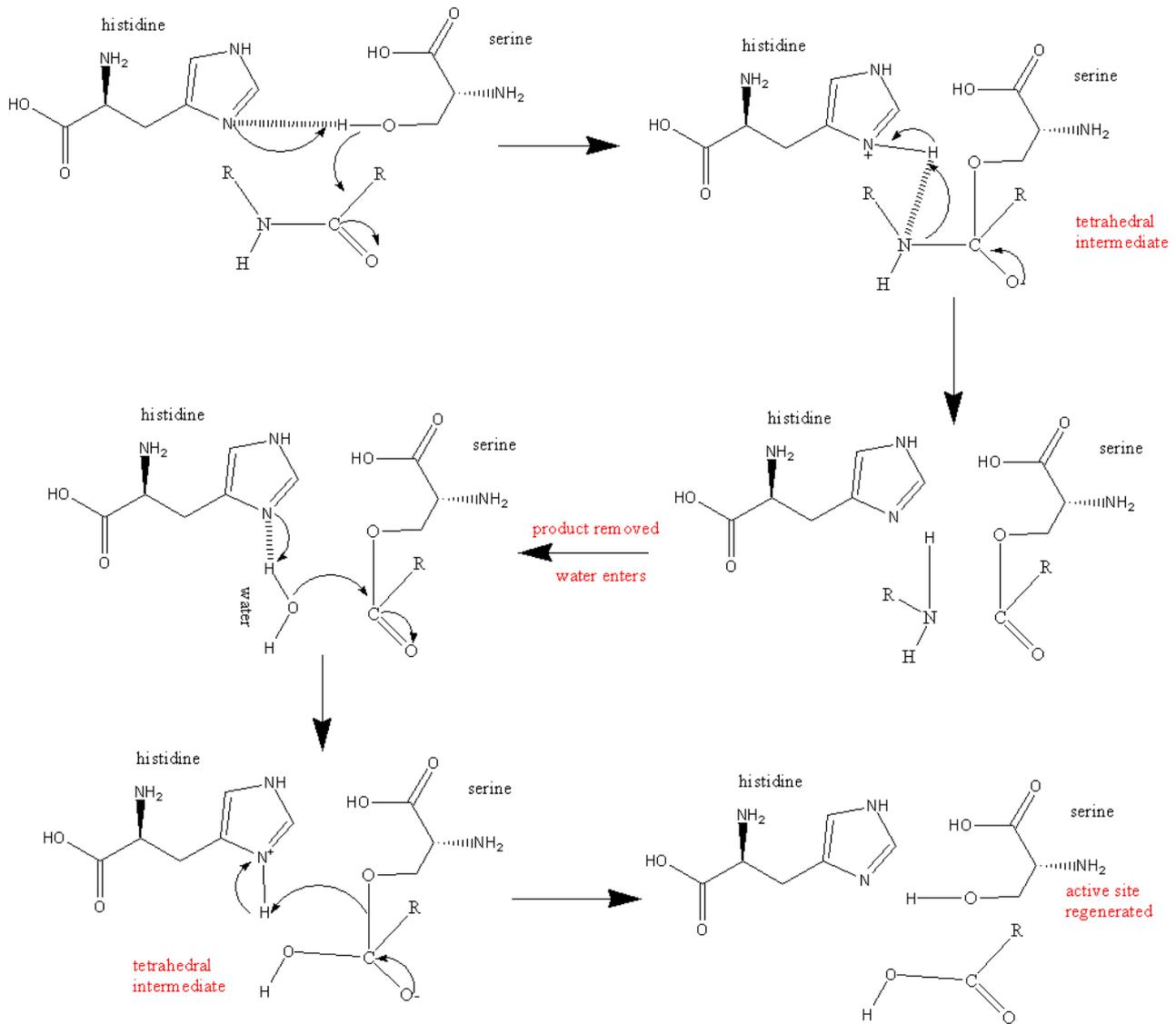


Рис. 5. Механизм действия каталитического центра сериновых протеаз на пептидные связи белковых субстратов (Википедия):

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.

б) ацилирование – ацильная группа S переносится на гидроксил E, и одновременно образуется первый продукт P₁ (аминная часть амидного S); в) деацилирование ацилфермента (собственно гидролиз) – разрыв сложноэфирной связи с образованием исходного активного фермента и второго продукта P₂ (карбоновая кислота).

Мишенями сериновых протеаз в основном являются пептидные связи, образованные остатками положительно заряженных аминокислот, лизина и аргинина, а также эфиры и амиды этих аминокислот (Фершт Э., 1980). Некоторые протеазы отделяют 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). Гидролиз белков может послужить сигналом начала ферментативного каскада реакций какого-либо биологического процесса, в том числе патологического.

1.4. Сериновые протеазы и протеолитические системы организма

Во многих протеолитических системах организма человека (свертывание крови, фибринолиз, комплемент, калликреин-кининовая система) основные компоненты представлены протеолитическими ферментами класса сериновых протеаз. В табл. 2 приведены типичные представители сериновых энзимов, играющих ключевую роль в некоторых протеолитических системах.

Таблица 2

Сериновые протеазы некоторых протеолитических систем организма

Английское название	Русское название	Синонимы	Номенклатурный номер и код семейства	Протеолитическая система
Thrombin	Тромбин	Fibrinogenase, 2-й фактор свертывания	3.4.21.5 family S1	Свертывание крови

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
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, Tissue-type plasminogen activator, tPA	3.4.21.68 family S1	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
---	---	--	-------------------------------------	------------

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 показаны на рис. 6. 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. 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.

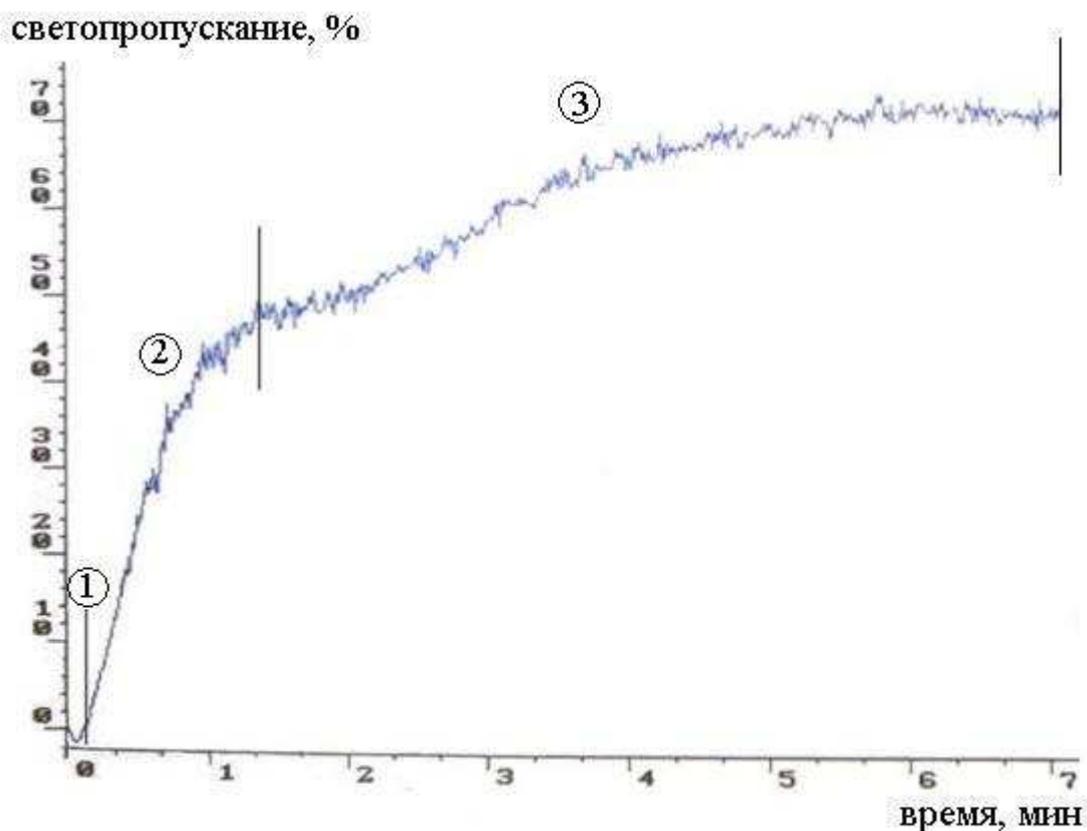


Рис. 6. Этапы образования тромбоцитарного тромба на примере АДФ-инициируемой двухфазной агрегации.

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

В ходе этих стадий происходят многоэтапные реакции активации неактивных факторов свертывания по механизму ограниченного протеолиза с образованием активных трипсиноподобных сериновых протеаз. 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 (тканевой активатор плазминогена, ТАП) являются сериновыми протеазами. Фактор свертывания X играет ключевую роль в процессе свертывания крови и рассматривается, как основной объект исследований направленных на поиск новых антикоагулянтов (Maignan S. et al., 2001). Тромбин - наиболее важный

ключевой энзим системы крови, катализирующий образование фибрина, активацию факторов свертывания крови V, VIII и XIII, а также агрегацию тромбоцитов (Arbogast H.P., 2004).

Агрегация тромбоцитов является частью гемостаза. В процессе активации агрегации тромбоцитов участвуют сериновые протеазы.

В организме одновременно со свертывающей системой крови функционирует система фибринолиза, в результате работы которой происходит распад сгустка фибрина. Активаторами фибринолиза выступают сериновые протеазы тканевой активатор плазминогена (ТАП) и активатор урокиназного типа (УПА) (Zorio E. et al., 2008). Ключевой протеазой фибринолитической системы является урокиназный активатор плазминогена (Shetty S. et al., 2008).

Другой важной протеолитической системой организма является система комплемента. Комплемент человека представляет собой многокомпонентную функциональную систему, включающую около 35 узкоспецифичных сывороточных белков (Sim R.V. et al., 2004), которые составляют около 4% от всех белков плазмы крови (Грицюк Т.Л. и соавт., 2005). Белки комплемента участвуют в распознании, очистке или уничтожении (прямым лизисом) микроорганизмов или изменившихся в следствии апоптоза или некроза клеток (Sim R.V. et al., 2004; Rooijackers S.H. et al., 2007). Часть основных белков системы комплемента являются сериновыми протеазами (см. табл. 2).

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 M.E. et al., 2005). Калликреины – ферменты класса сериновых протеаз катализирующие превращение кининогена в кинины.

Все описанные выше протеолитические системы взаимосвязаны между собой и другими физиологическими процессами. Именно сериновые ферменты данных протеолитических каскадов выступают связующим звеном (рис. 7). Фактор X и другие энзимы каскада свертывания, принадлежащие к семейству

трипсин-подобных протеаз, вовлечены в многочисленные физиологические процессы организма. Тромбин и другие сериновые протеазы активируют и катализируют агрегацию тромбоцитов (Arbogast H.P., 2004). П.П. Бельтюковым и соавторами (2003), установлено, что калликреин эффективно гидролизует С3 компонент комплемента, снижая активность всей системы комплемента человека. Калликреин-кининовая система имеет многочисленную связь и с другими важными метаболическими магистралями, такими как система свертывания крови и ренин-ангитензиновая система (Moreau M.E. et al., 2005). В свою очередь ренин-ангиотензиновая система, взаимодействует с различными протеолитическими системами, начиная классическим ограниченным линейным протеолизом и заканчивая сложным каскадом с многочисленными посредниками, рецепторами и многофункциональными энзимами (Ribeiro-Oliveira A.Jr. et al., 2008).

Сбой в функционировании этих важнейших протеолитических систем организма сопутствует различным патологическим состояниям. Часть компонентов системы комплемента не имеет естественных ингибиторов (серпинов), поэтому чрезмерная активизация комплемента является причиной воспалительного процесса (Sim R.V. et al., 2004). Неадекватный запуск системы комплемента может внести определенный вклад в повреждение тканей (Sim R.V. et al., 2004; Грицюк Т.Л. и соавт., 2005). Активные кинины вовлечены во многие патологические процессы (Moreau M.E. et al., 2005). Нарушение регуляции протеолитической активности факторов гемостаза говорит о неправильной работе свертывающей и фибринолитической систем крови. Сериновые факторы свертывания вовлечены в такие патологии, как эмфизема, артрит, сердечно-сосудистые заболевания. При хирургических вмешательствах чрезмерную активацию тромбина, на фоне снижения уровня ингибиторов крови (Пучков К.В. и соавт., 2007), рассматривают как фактор риска тромбозов (Иванов В.В. и соавт., 2007).

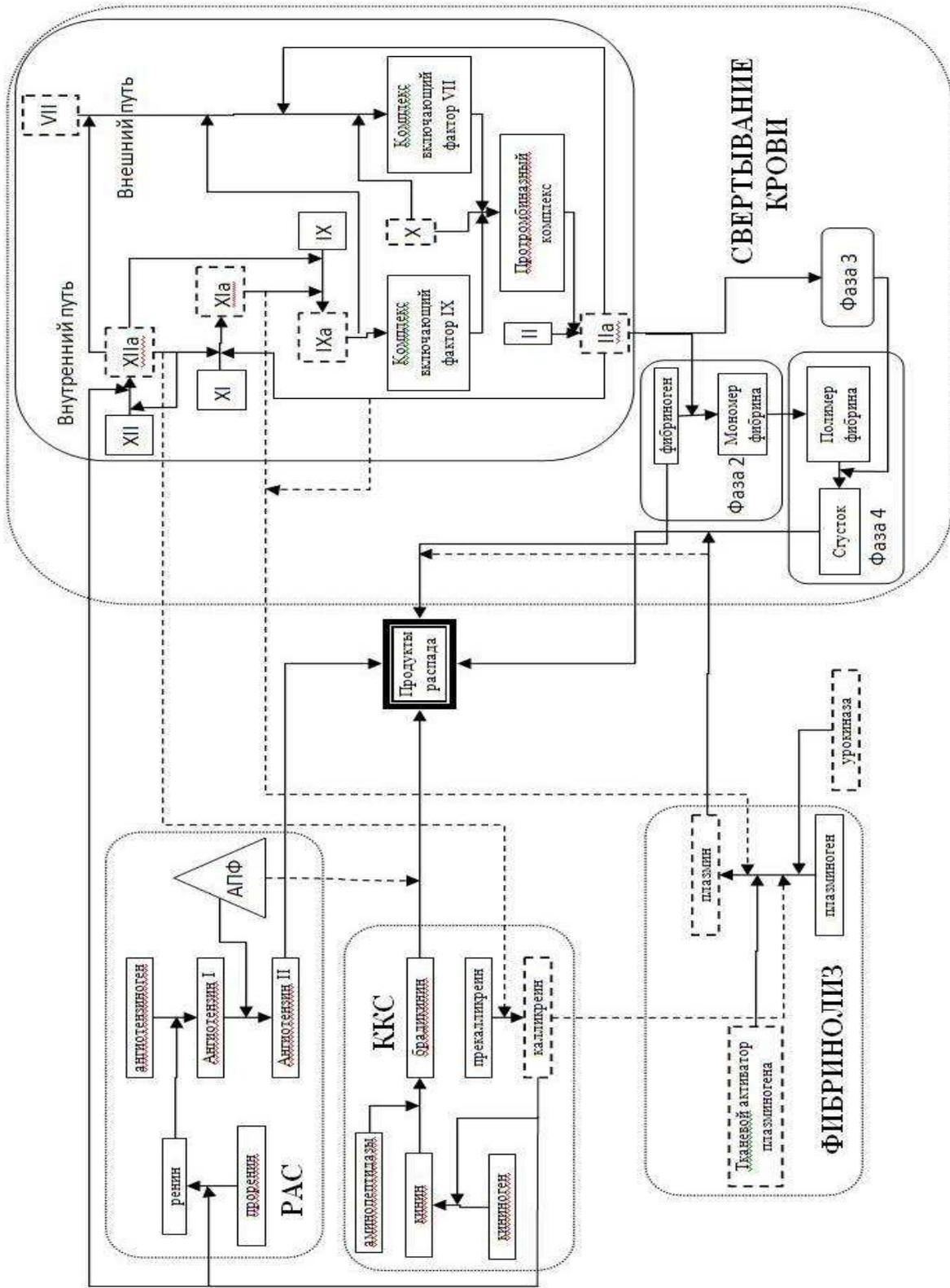


Рис. 7. Взаимосвязь протеолитических систем организма через сериновые протеазы

А ПФ – ангиотензин-превращающий фермент, ККС – калликреин-кининовая система, РАС – ренин-ангиотензиновая система.

Протеолитические ферменты фибринолиза участвуют в развитии тромбоза, атеросклероза, рака (Zorio E. et al., 2008). Активизация агрегации тромбоцитов и антиагрегационные агенты являются важными патофизиологическими элементами заболеваний сердца (Duffy B. et al., 2005; Jennings L.K. et al., 2008).

Регуляция физиологических процессов, сопряженных с протеолизом, заключается в ингибировании сериновых протеаз, которые являются неотъемлемыми компонентами протеолитических систем. Поиску эффективных и безопасных гепарин-подобных антикоагулянтов были посвящены десятки лет и сводились к исследованию прямого ингибитора тромбина (Nutescu E.A. et al., 2008; Prechel M. et al., 2008). Сегодня антикоагулянтная терапия предполагает последовательное применение прямых (нефракционированный гепарин, низкомолекулярные гепарины) и непрямых (антивитамины К) антикоагулянтов (Пашин В.С. и соавт., 2007). Классические противосвертывающие лекарства, применяющиеся в течение более 50 лет, очень эффективны, но имеют недостатки, связанные с их применением в клинике (Pengo V., 2005). Создание новых методов лечения сердечных заболеваний сводится к исследованию антиагрегационной и антикоагулянтной терапии (Kandzari D.E., 2006). В последнее время все чаще обсуждается клиническая практика использования принципов антиагрегационной и противотромботической терапии (Casterella P.J. et al., 2008). Ингибиторы факторов свертывания крови являются основным объектом исследования регуляции гемостаза при сердечно-сосудистых заболеваниях (Klauss V. et al., 2006). Ясно, что разработка регуляторов протеолиза в клинике, остается актуальной проблемой, особенно в гемостазиологии.

Глава 2. ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕАЗ – РЕГУЛЯТОРЫ ПРОТЕОЛИЗА

2.1. Роль ингибиторов протеаз в регуляции протеолиза

В регуляции протеолиза участвуют ингибиторы протеолитических ферментов. В организме они представлены специфическими белками. Ингибиторы (с латинского *inhibere* – останавливать, сдерживать) обладают способностью затормаживать или прекращать действие ферментов. Основная функция ингибиторов протеолиза заключается в блокировании нарастающей активности протеаз. По механизму воздействия ингибиторы делят на обратимые и необратимые. Классификация ингибиторов представлена в таблице 3. Ингибиторы встречаются в растениях, млекопитающих, червях, микробах и других многочисленных формах жизни (Zavasnik-Bergant T., 2008). На сегодняшний день белковые ингибиторы подразделяются на 38 кланов и 75 семейств. Девять семейств, приходится на ингибиторы растительного происхождения (Мосолов В.В. и соавт., 2005).

Таблица 3

Классификация ингибиторов протеолитических ферментов

Ингибиторы	Естественные	Низкомолекулярные	Неспецифические		Перекиси; соли тяжелых металлов	
			Специфические		Пепстатин; химостатин; фосфорамидон; лейпептин; эластиналь; антипаин и др.	
		Высокомолекулярные	Небелковые	Мукополисахариды; полианионы; гиалуриновая кислота; гепарин и др.		
			Белковые	Животные	Секреторные и тканевые ингибиторы типа Казаля и Кюнитца-Нортропа; овоингибиторы; микробные.	
	Растительные	Ингибиторы типа Кюнитца и Боумана-Бирка (бобовые, злаковые, клубневые растения).				
	Синтетические	ε-аминокапроновая кислота, пара-аминометилбензойная кислота, габексат, аминотетрациклогексанкарбоновая кислота и др.				

Например, в соевых бобах присутствуют в ингибиторы семейств Боумана-Бирка и Кюнитца (Csáky I. et al., 2004). Из числа низкомолекулярных ингибиторов сегодня известно около 400 соединений.

Регулируя деятельность внутри- и внеклеточных протеаз ингибиторы поддерживают нормальный протеолиз организма (Zavasnik-Bergant T., 2008). Ингибиторы включены в различные биологические процессы и выполняют разнообразные функции. У животных организмов они участвуют в ангиогенезе, апоптозе (Richardson J. et al., 2006), формировании иммунного ответа (Zavasnik-Bergant T., 2008), регуляции системы гемостаза, регенерации ткани, сосудистой проницаемости, почечного протеолиза (Suzuki K., 2008). У растений ингибиторы защищают от протеаз паразитов (Дунаевский Я.Е. и соавт., 2005; Rashed N.A. et al., 2008), регулируют эндогенную активность протеаз в период прорастания семян.

Человеческая плазма содержит большое количество ингибиторов протеаз, которые составляют около 10% от общей массы плазменных белков (Khan H. et al., 2002). Ингибиторы протеолитических ферментов человека участвуют в протеолитических каскадах организма (Silverman G.A. et al., 2004) и являются ключевыми регуляторами многочисленных биологических процессов, которые инициируют воспаление, свертывание крови, ангиогенез, апоптоз, в том числе активизацию системы комплемента (Richardson J. et al., 2006). К ингибиторам организма человека относят секретогранин, цистатин А, ингибитор кальпастина, сарвивин, латексин, α_2 -АП, α_1 -АТ, α_2 -МГ, антитромбин и другие, уровень которых снижается при патологии, сопряженной с агрессивным протеолизом. Поддержание ингибиторного потенциала организма, при таких патологических состояниях, является серьезной проблемой медицины.

2.2. Серпины – ингибиторы сериновых протеаз

Активность сериновых протеиназ регулируется белками-ингибиторами суперсемейства серпинов (**SER**ine **P**rotease **I**Nhibitor). Представители серпинов присутствуют в трех основных формах жизни бактериях, археях и эукариотах, а также нескольких эукариотных вирусах (Silverman G.A. et al., 2004). Белки-ингибиторы человека включены в отдельное семейство I4. Геном человека кодирует, по крайней мере, 35 серпинов (Silverman G.A. et al., 2004). В плазме крови содержится около 2% серпинов от всех белков плазмы (Щербак И.Г., 2005). К ним относят α_1 -АТ, α_2 -АП, С1-ингибитор, антитромбин, ингибиторы активаторов плазминогена, нейросерпин, бикунин и другие.

α_1 -АТ – гликопротеид, обеспечивает 70% всей антитриптической активности сыворотки или плазмы (Щербак И.Г., 2005). α_1 -АТ эффективно подавляет активность трипсина, химотрипсина, плазмина, тромбина, эластазы, калликреина, бактериальных протеиназ. Служит маркером острой фазы воспаления (Correale M. et al., 2008).

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

Ингибиторы активаторов плазминогена (РАI). Это ингибиторы, представленные тремя типами гликопротеидов (Zorio E. et al., 2008), которые являются ключевыми компонентами фибринолитической системы (Shetty S. et al., 2008), как первичные физиологические ингибиторами двух активаторов плазминогена УПА и ТАП (Dupont D.M. et al., 2008).

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

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.

C1-ингибитор является сильным противовоспалительным белком и основным ингибитором системы комплемента (Wagenaar-Bos I.G. et al., 2006; Wouters D. et al., 2008). Кроме препятствия действию компонентов комплемента, C1-ингибитор, снижает активность калликреина и фактора свертывания XII (Bracho F.A., 2005). Участвует в процессах гемостаза (Cicardi M. et al., 2005; Nettis E. et al., 2005; Bernstein I.L., 2008).

Серпины подавляют преимущественно активность сериновых протеиназ и в меньшей степени цистеиновых. Ингибирование сериновых протеаз основано на прочном связывании ингибитора с ферментом (рис. 8), однако механизм расшифрован не полностью (Гладышева и соавт., 2001; Silverman et al., 2001; Janciauskiene, 2001).

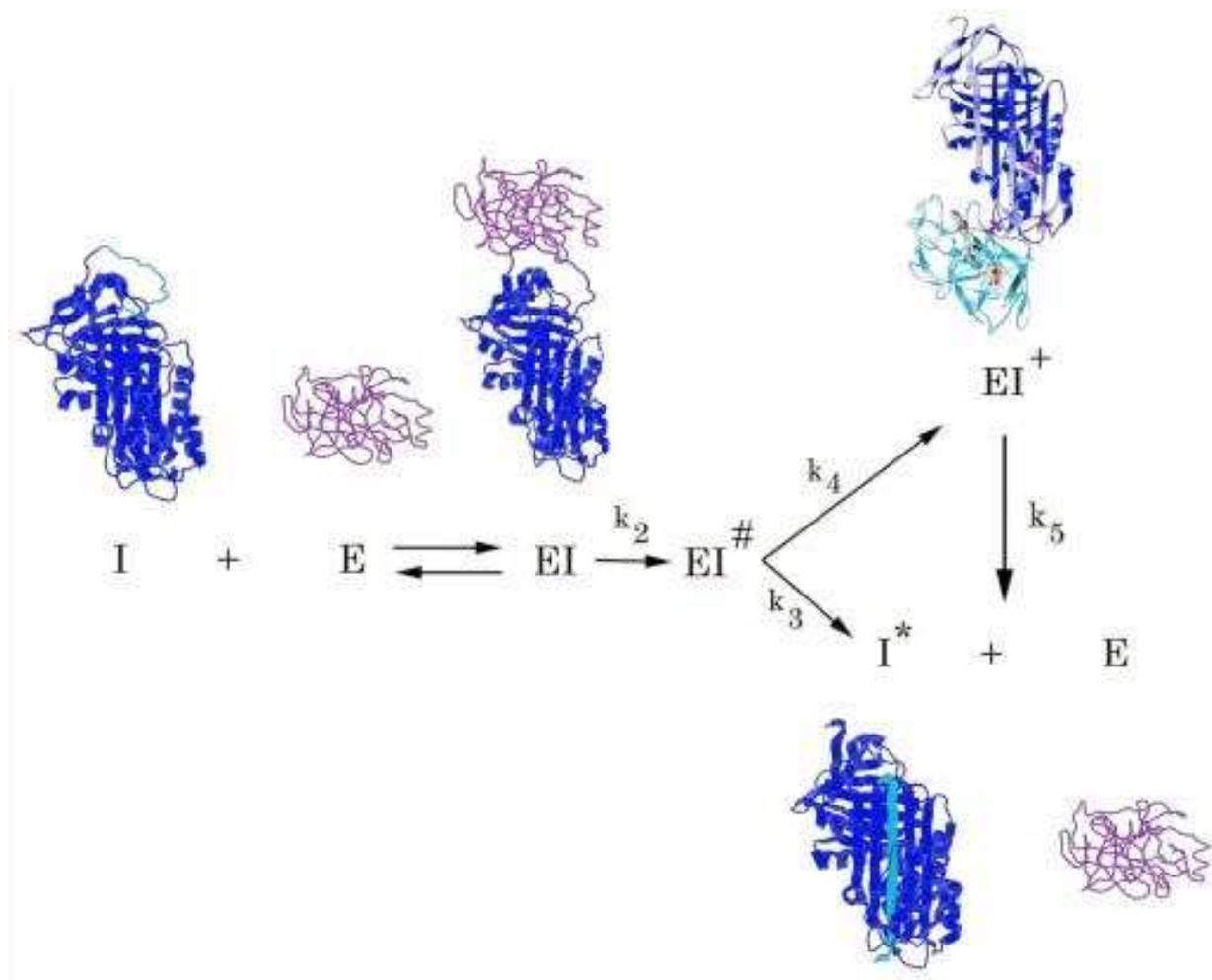


Рис. 8. Образование и судьба комплекса серпин-протеаза (Silverman et al., 2001)

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).

Человеческий организм обладает мощным антипротеазным потенциалом, в основном за счет серпинов. Серпины, основные регуляторы процессов ограниченного протеолиза (Поддорольская Л.В. и соавт., 1996), участвуют в фундаментальных физиологических процессах, таких как воспаление, свертывание, ангиогенез, апоптоз, активация комплемента (Richardson J. et al., 2006), защищают клетки от внутреннего и внешнего протеолитического повреждения (Silverman G.A. et al., 2004). Биологические функции серпинов человека многообразны (рис. 9) и обусловлены не только непосредственным ингибированием протеолитических ферментов.

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 условиях патологии собственного ингибиторного потенциала не всегда достаточно, что приводит к сдвигу протеазно-ингибиторного баланса в сторону протеаз. Это стало главной причиной применения экзогенных регуляторов протеолиза в терапевтических целях.

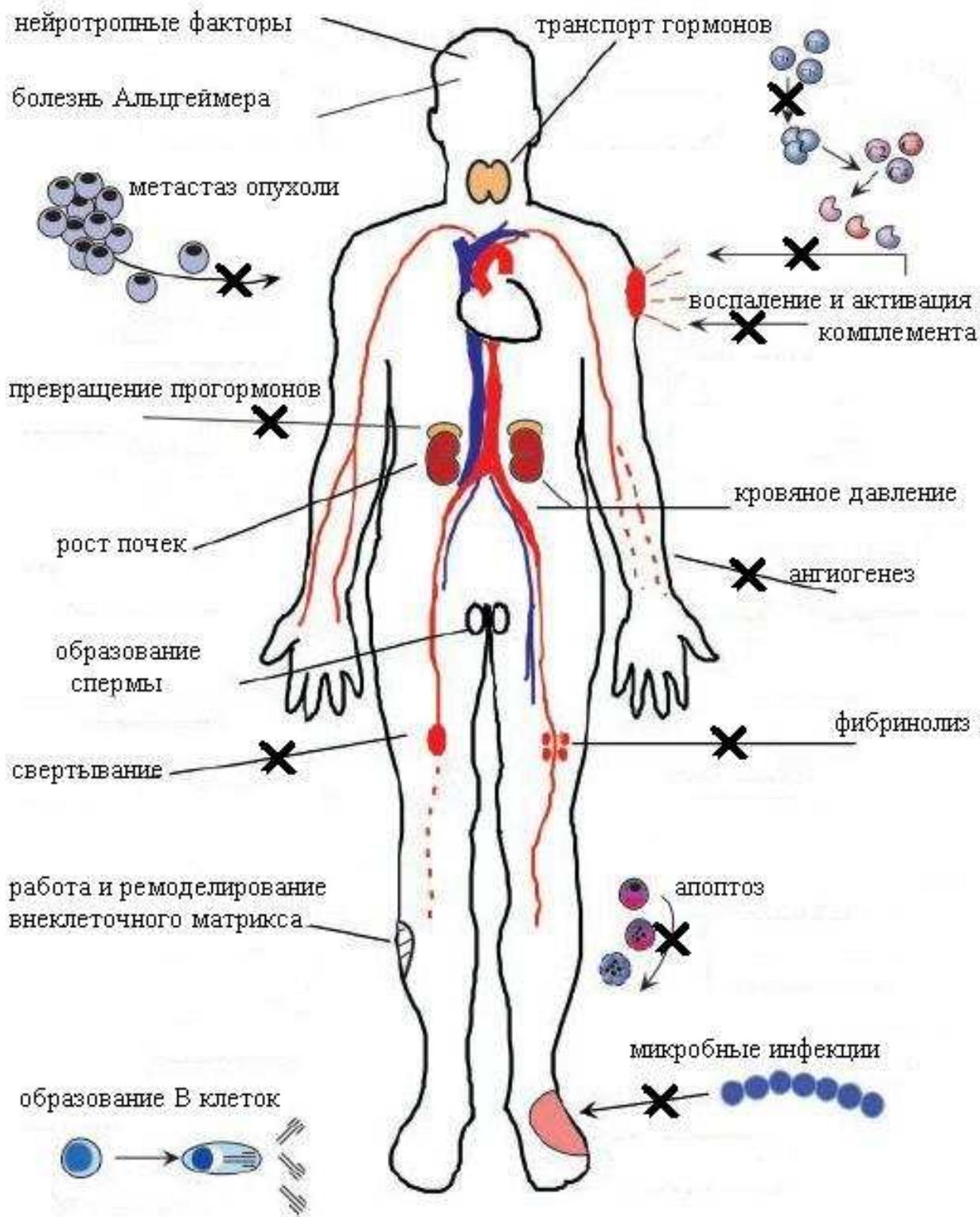


Рис. 9. Биологические функции серпинов человека (Silverman et al., 2001)

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

Другой важной причиной необходимости применения ингибиторов сериновых протеаз в клинике, являются наследственный недостаток или отсутствие какого-либо серпина. Сегодня насчитывается около 50 наследственных заболеваний, в основе которых лежат нарушения функционирования генов, ответственных за экспрессию протеаз и их ингибиторов. Наиболее распространенными заболеваниями, связанными с врожденным дефицитом серпинов, являются эмфизема легких и ангиоэдема. Врожденный дефицит α_1 -АТ обуславливает развитие эмфиземы легких (Tirado-Conde G. et al., 2008), при которой протеазы разрушают соединительную ткань альвеолярной стенки (Бородин Е.А. и соавт., 2000). В развитии и течении наследственной ангиоэдемы ключевую роль играет отсутствие С1-ингибитора (Cicardi M. et al., 2007; Muszyńska A. et al., 2008).

В качестве регуляторов протеолиза используются синтетические ингибиторы (аминометилциклогексанкарбоновая кислота, ϵ -аминокапроновая кислота, пара-аминометилбензойная кислота, габексат, бивалирудин), а также белковые ингибиторы естественного происхождения (овомукоиды, апротинин). Широкое применение получили фармацевтические препараты «Гордокс», «Контрикал» и «Трасилол», в которых действующим веществом является апротинин – поливалентный ингибитор протеиназ типа Кюнитца-ВРТИ, выделяемый из органов крупного рогатого скота. Препараты апротинина применяются в основном для профилактики и лечения панкреатитов и кровотечений сопряженных с гиперфибринолизом. С целью пополнения арсенала лекарственных средств новыми регуляторами протеолиза и расширения области их применения в клинике, научные исследования различных серпинов, продолжаются до сих пор. Некоторые исследователи (Neromniashchikh T.S. et al., 2008) считают, что для эффективности лечения воспалительных процессов и аутоиммунных заболеваний необходимо комплексное применение белков иммуномодуляторов, хемокинсвязывающих белков, а также ингибиторов сериновых протеаз. Серпины вирусов уже рассматриваются в качестве альтернативных иммуномодуляторов (Lucas A. et

al., 2004; Richardson J. et al., 2006). В лечении болезней, сопровождающихся воспалением, плазменный С1-ингибитор видится наиболее привлекательным терапевтическим белком (Bracho F.A., 2005; Davis A.E. 3rd et al., 2007; Wouters D. et al., 2008). Имеется положительный опыт использования серпинов в эффективном и безопасном лечении наследственной ангиоэдемы (Bas M. et al., 2007; Zuraw B.L. et al., 2008; Bernstein J.A., 2008). Многие исследования посвящены гемостатическим свойствам серпинов. Ингибиторы факторов свертывания крови являются сегодня основным объектом исследования в работах, посвященных регуляции агрегации тромбоцитов при сердечно-сосудистых заболеваниях (Klauss V. et al., 2006; Jennings L.K. et al., 2008). Белки ингибирующие сериновые факторы свертывания успешно применяют, как регуляторы агрегации тромбоцитов (Rothman M.T., 2005; Nutescu E.A. et al., 2006; Lepor N.E., 2007; Fareed J. et al., 2008; Hoppensteadt D.A. et al., 2008; Moser M. et al., 2008). Ингибиторы, вырабатываемые железами клещей, обладают антигемостатическими свойствами (Pierre-Paul P. et al., 2006). Синтезирован аналог гирудина пиявок – прямой ингибитор тромбина – бивалирудин. Бивалирудин эффективно задерживает свертывание крови (Connors J.J. 3rd, 2004; Lehman S.J. et al., 2006) и активно используется в качестве антикоагулянта в кардиологии (Warkentin T.E. et al., 2008). В литературе все больше встречается сообщений об эффективности лечения воспалительных процессов и аутоиммунных заболеваний с применением ингибиторов сериновых протеаз (Lucas A. et al., 2004; Bracho F.A., 2005; Richardson J. et al., 2006; Wagenaar-Bos I.G. et al., 2006; Bas M. et al., 2007; Bernstein J.A., 2008; Davis A.E. 3rd et al., 2007; Nepomniashchikh T.S. et al., 2008; Wouters D. et al., 2008; Zuraw B.L. et al., 2008).

В последнее время все больший интерес вызывают терапевтические свойства серпинов растений. Белковые ингибиторы сериновых протеаз широко распространены в растениях и к настоящему времени получены из многих источников (Цыбина Т.А. и соавт., 2004). Недавние исследования показали, что белки из семян гречихи, пшеницы, люпина, ржи, перца, горчицы, картофеля

являются эффективными ингибиторами трипсиноподобных протеаз (Цыбина Т.А. и соавт., 2004; Дунаевский Я.Е. и соавт., 2005; Сперанская А.С. и соавт., 2006). Соевый ингибитор трипсина типа Боумана-Бирка, неаллергенный и нетоксичный для человека, уже проходит клинические испытания в качестве противоракового лекарственного препарата (Kennedy A.R., 1998; Losso J.N., 2008). Бобы сои также содержат не менее известный ингибитор трипсина типа Кюнитца.

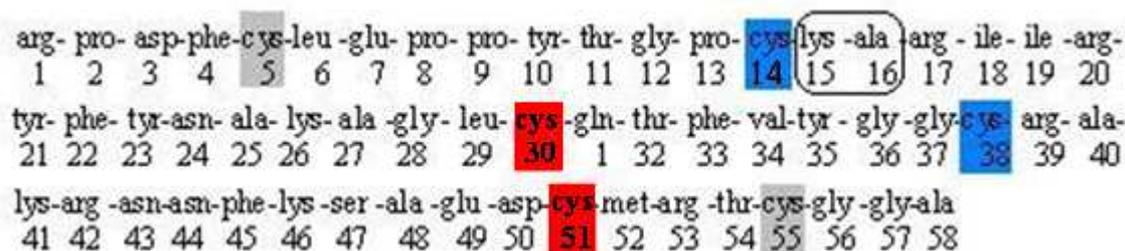
2.3. Апротинин - поливалентный ингибитор протеаз

Апротинин – панкреатический ингибитор Кюнитца, один из наиболее широко изученных глобулярных белков. Он был открыт независимо разными исследователями. В 1930 г. группа исследователей во главе Kraut выделили из бычьей околоушной железы инактиватор калликреина, а в 1936 г. Кунитц и Нортроп, выделив его из бычьей поджелудочной железы, описали как ингибитор трипсина. Апротинин обнаружен в разных органах млекопитающих (легкие, слюнные железы, селезенка, печень, семенные пузырьки, щитовидная железа, почки и др.). Другие химические и коммерческие названия апротинина: панкреатический ингибитор трипсина, поливалентный ингибитор протеиназ Кюнитца-Нортропа, Antikrein, Antilysin(e), Kallikrein-trypsin inactivator, KirRichter, Kunitz protease inhibitor, **Basis Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI)**, Antagosan, Bayer A 128, Kallikrein-trypsin inactivator, Fosten, Iniprol, Onquinin, Repulson, RP-9921, Ryker 52G, Trasylol, Triazinin, Zymofren. Молекулярная формула $C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$, молекулярная масса составляет около 6514 атомных единиц массы (в научной литературе и коммерческих каталогах приводятся цифры 6512, 6511.23, 6511.52). Изоэлектрическая точка 10.5.

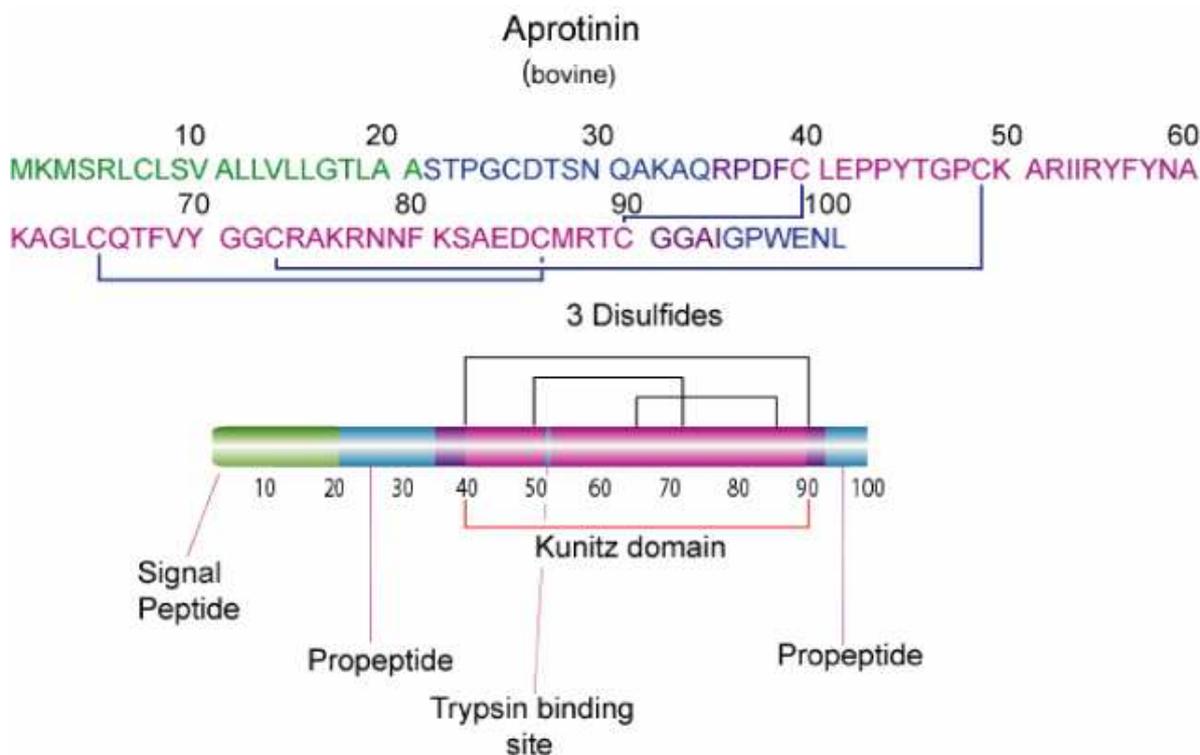
Активность апротинина выражают чаще в калликреин инактивирующих единицах КИЕ (KIU – Kallikrein Inhibitor Unit). 1 КИЕ равна количеству ингибитора подавляющего активность 2 биологических калликреиновых единиц на 50% в оптимальных условиях. Другим вариантом являются трипсин-

ингибиторные единицы ТИЕ (TIU – Trypsin Inhibitor Unit). 1 ТИЕ это количество ингибитора в мг которое гидролизует 1 мкмоль бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилида (БАПНА) в минуту при pH 7.8 и 25°C. 1 ТИЕ снижает активность двух единиц трипсина на 50%. 1 ТИЕ соответствует по разным данным примерно от 900 до 1300 КИЕ. 1 мг апротинина эквивалентен примерно 7143 КИЕ. Активность панкреатического ингибитора протеаз может выражаться и в других единицах.

Первичная структура апротинина представлена одноцепочечным полипептидом из 58 аминокислотных остатков (рис. 10, табл. 4).



a)



б)

Рис. 10. Аминокислотная последовательность (а) и доменная структура полипептидной цепи апротинина (б) (www.sigmaaldrich.com).

Дисульфидные мостики образованы между остатками аминокислот 5 и 55, 14 и 38, 30 и 51. Активный центр (аминокислоты 15 и 16) обведен черной линией. Расшифровка аминокислотных остатков приведена в приложении.

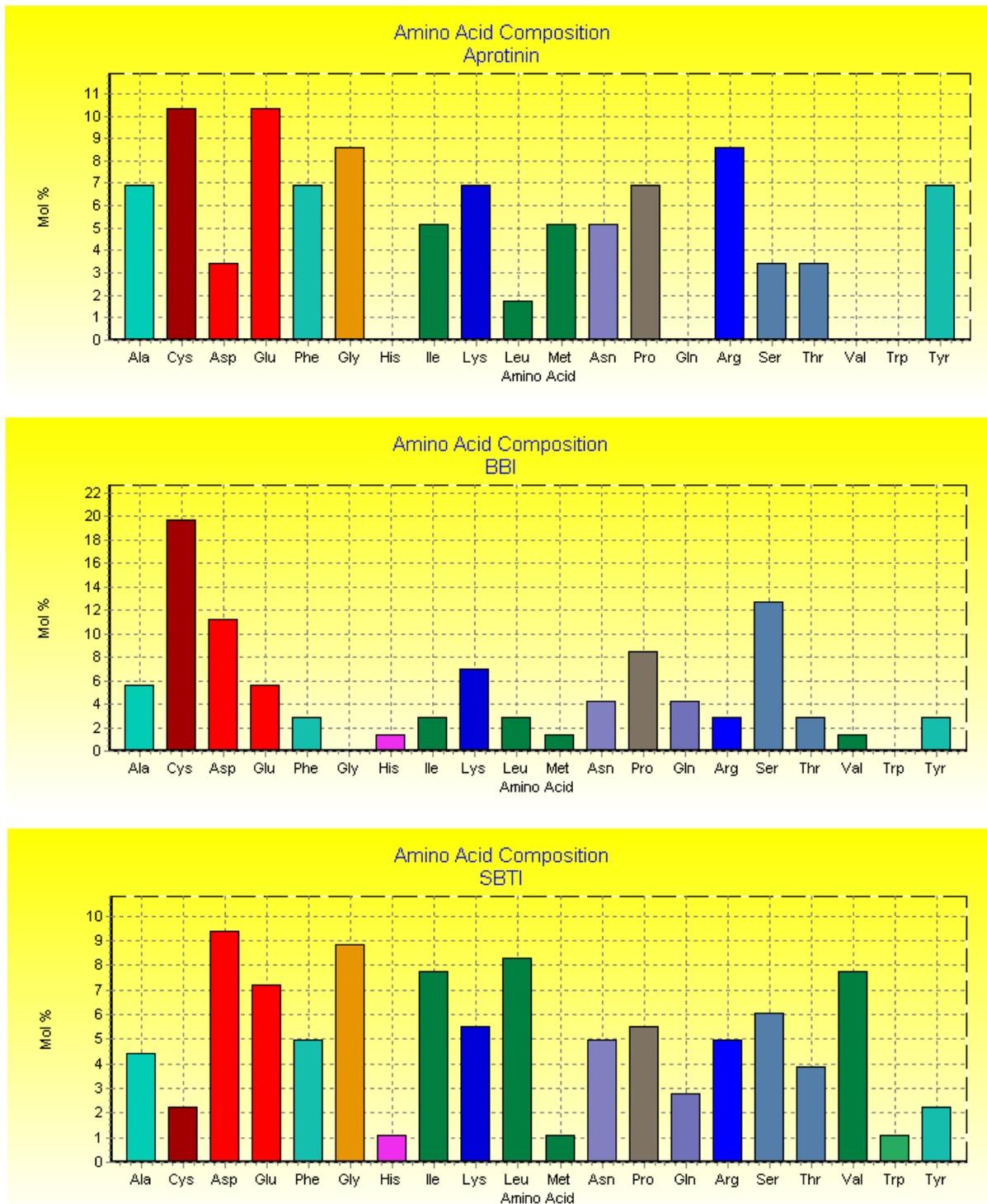


Рис. 11. Соотношение аминокислотных остатков в составе аprotинина (aprotinin) и соевых ингибиторов типа Кюнитца (SBTI) и Боумана-Бирка (BBI).

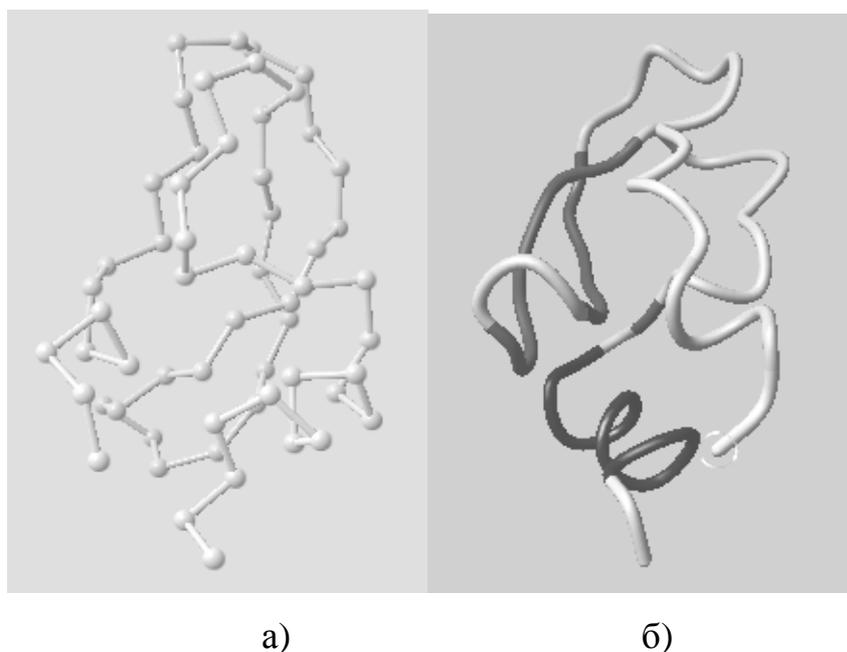


Рис. 13. Трехмерные модели третичной структуры полипептидной цепи апротинина: а) шаростержневая модель; б) трубчатая модель.

При исследовании образцов крови 56 пациентов, перенесших операции на сердце, установлено, что апротинин (Трасилол) значительно продлевает активированное (цеолит) или неактивированное время свертывания цельной крови *in vitro* (Despotis G.J. et al., 1996).

В 1953 году Frey впервые использовал в клинической практике апротинин для лечения острого панкреатита (Дементьева И.И. и соавт., 1996). Сегодня апротинин выпускается рядом фармацевтических фирм и широко известен под названиями «Гордокс», «Контрикал», «Трасилол», «Апротекс», «Ингипрол», «Ингитрил». Препараты апротинина применяют для профилактики и лечения панкреатитов, панкреанекрозов, гиперфибринолитических кровотечений (после травм или операции), осложнений тромболитической терапии, а также различных форм шока (эндотоксический, травматический, гемолитический). Наиболее широко апротинин используется в кардиохирургии (Чарная М.А. и соавт., 2005). В клеточной биологии апротинин используется в качестве ингибитора фермента для предотвращения деградации белка при гомогенизации клеток.

Как фармацевтический препарат аprotинин имеет ряд существенных недостатков:

1) быстрое выведение аprotинина из организма вынуждает на повторное его применение, что обуславливает высокую стоимость всего лечения;

2) низкая эффективность. За последние 50 лет эффективность применения аprotинина в лечении острых панкреатитов показывает разочаровывающие результаты (Smith M. et al., 2009). Предпринимаются попытки модифицировать аprotинин для повышения его эффективности (Hanson W.M. et al., 2007);

3) возможно появление аллергических реакций и реже развитие анафилактического шока. Как чужеродный человеку белок, аprotинин, может вызывать аллергические реакции с различными осложнениями: тромбозы, кожные высыпания, кратковременное снижение артериального давления, нарушение мозгового кровообращения, спазм бронхов, редко шокоподобные реакции (Бородин Е.А. и соавт., 2000; Михайлов И.Б., 2002). В период с 1963 по 2003 годы клинического использования аprotинина зафиксировано 124 случая (61 сообщение) анафилактических реакций, 11 из которых закончились летальным исходом. При повторном применении риск анафилаксии составляет приблизительно 2,8% (Beierlein W. et al., 2005). В 2007-2008 годах Научный комитет Европейского Медицинского Агентства приостановил продажу аprotинина, и разрешил использовать его только для исследований (http://www.ema.europa.eu/ema/pages/news_and_events/news/2012/02/news_detail_001447.jsp).

4) вероятность одновременного внесения в организм инфекционного начала, характерная для всех белковых препаратов, выделяемых из тканей животных;

5) высокая стоимость, обусловленная технологией его производства. Сейчас эту проблему пытаются решить с помощью методов генной инженерии, создавая рекомбинантный фармацевтический аprotинин (Zhong Q. et al., 2007; Yang L. et al., 2008; Meta A. et al., 2009; Sun Z. et al., 2009).

В связи с вышеизложенным поиск и разработка новых препаратов ингибиторов протеолиза лишенных недостатков, присущих апротинину, является весьма актуальной задачей современной медицины. Один из подходов к решению этой задачи состоит в исследовании возможности использования ингибиторов протеаз растительного происхождения.

2.4. Соевый ингибитор протеаз типа Боумана-Бирка

Ингибитор трипсина и химотрипсина был выделен из сои Боуменом в 1946 г. и в дальнейшем описан Бирком и соавторами (1963). Отсюда пошло название самого ингибитора и подобных ему белков (сегодня известно около 300 гомологов из числа белков только растительного происхождения), обнаруженных у многих других однодольных и двудольных растений (ячмень, люцерна, фасоль, люпин, арахис, чечевица, долихос, эритрина, рис и др.).
Синонимы: Bowman–Birk inhibitor, BBI. Молекулярная масса около 7872,47 атомных единиц массы. Один мг белка будет препятствовать $\geq 0,5$ мг трипсина активностью в 10000 ВАЕЕ единиц на мг (N- α -бензоил-L-аргинина этиловый эфир), а также $\geq 1,0$ мг химотрипсина активностью в 40 ВТЕЕ единиц на мг (N-бензоил-L-тирозина этиловый эфир).

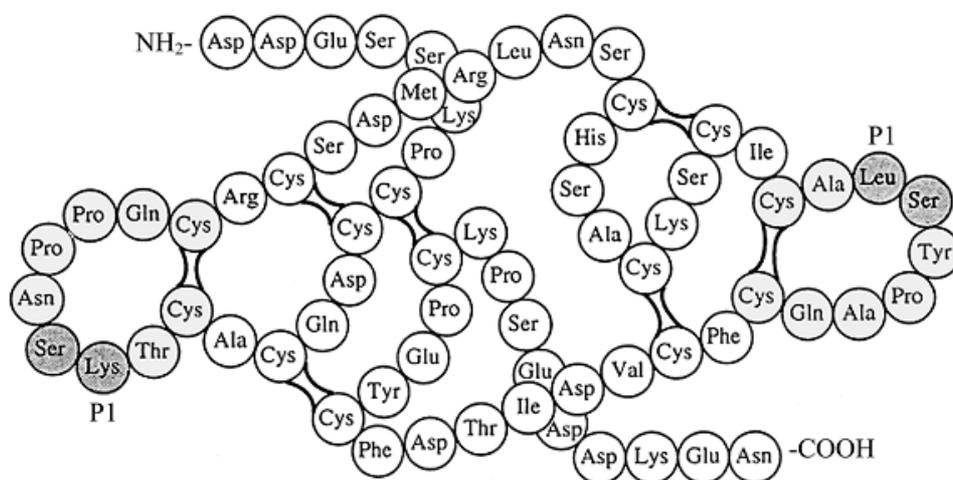


Рис. 14. Дисульфидные связи в BBI (Rui-Feng et al. 2005).

Активные центры выделены темным цветом.

Первичная структура мономерного ВВІ представлена 71 аминокислотным остатком. Зрелая форма белка имеет 7 дисульфидных мостиков. Данный ингибитор является двуглавым – имеет два независимых активных центра Lys16-Ser17 (трипсин) и Leu43-Ser44 (химотрипсин, эластаза). Внутри и между видами сои найдено несколько вариантов ВВІ.

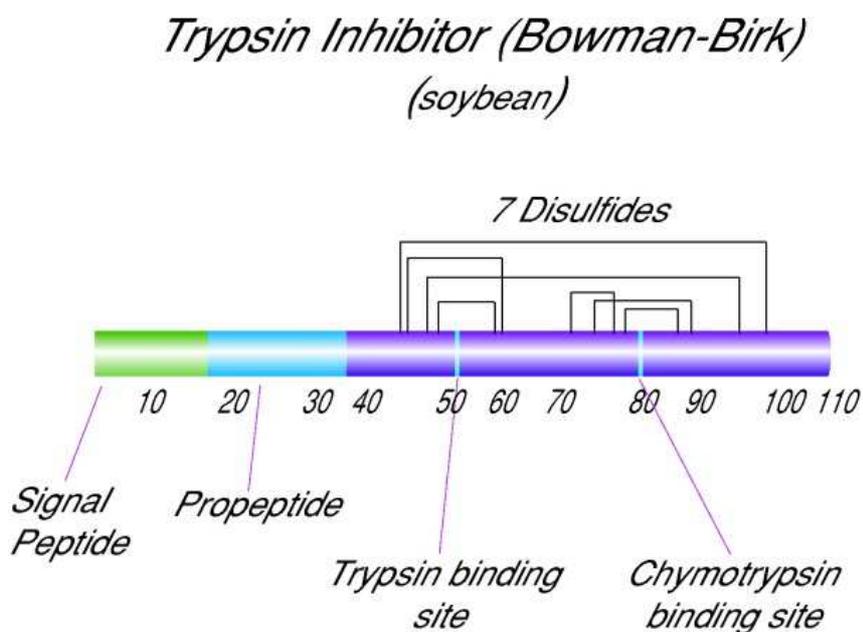


Рис. 15. Доменная структура полипептидной цепи предшественника ВВІ (Sigma Aldrich, www.sigmaaldrich.com).



Рис. 16. Третичная структура полипептидной цепи ВВІ (файл структуры 1BBI, построена Werner M.H. и Wemmer D.E. в 1992 году методом NMR).

Механизм ингибирования аналогичен другим ингибиторам сериновых протеаз. Особенностью ингибитора Боумана-Бирка является то, что взаимодействуют четко определенные дисульфидно связанные короткие регионы бета-укладки. Каждый активный центр ВВІ может образовывать комплекс с протеазой, а поскольку действие этих центров не является конкурентоспособным, то ВВІ имеет возможность формировать тройной комплекс с двумя протеазами. В основном ингибиторы семейства Боумана-Бирка подавляют сериновые пептидазы S1 семейства, а также S3 пептидазы (по классификации базы Merops).

Опыты с лабораторными животными показывали, что ВВІ обладает высокой биодоступностью (Losso, 2008). Он может всасываться через эпителий кишечника, и через три часа после приема пищи до 40% ВВІ попадает в кровь. При выделении ВВІ сохраняет антипротеазную активность. От одного до двух процентов при проглатывании радиоактивно меченного ВВІ обнаруживали во всех органах, за исключением мозга.

На протяжении более двух десятилетий, диетологи считали ВВІ антипитательным веществом, однако, на основе последних экспериментов некоторые биохимики в области здорового питания начали признавать, что может ВВІ быть полезным для здоровья человека и может быть использован для профилактики и лечения ряда заболеваний. ВВІ не является аллергенным или токсичным для человека.

Данный протеин не имеет клинического применения. Однако последние исследования показывают возможность его использования в медицине. Так, недавно установлен противовоспалительный эффект ингибитора, связанный со снижением выработки провоспалительных цитокинов и последующей нейротоксичности у крыс (Li et al., 2011). Показано, что ВВІ способствует более позднему наступлению экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита и снижению тяжести заболевания у мышей по сравнению с контрольной группой (Dai et al., 2011). ВВІ уменьшает атрофию скелетных мышц у белых мышей

(отмечено увеличение массы и силы), вероятно, через снижение TGF- β (1) и фиброза (Morris et al., 2010).

Сегодня BBI рассматривается как мощное средство химиопрофилактики. Ряд исследований на животных показывает выраженные антиканцерогенные свойства BBI (Palavalli et al., 2012). Так в исследовании влияния двух основных изоформ BBI (IBB1 и IBBD2) на клетки аденокарциномы толстой кишки человека установлено антипролиферативное действие ингибиторов (Clemente et al., 2010). Воздействуя BBI на клетки рака предстательной железы человека (LNCaP) и аденокарциномы предстательной железы трансгенных крыс (TRAP) зафиксировано подавление жизнеспособности клеток в эксперименте на людях и развития аденокарциномы у крыс (Tang et al., 2009). Антиканцерогенный эффект BBI отмечен при внутрибрюшинном введении ингибитора крысам с саркомой яичек (Sakurai et al., 2008).

BBI не имеет статус GRAS, т.е. не признан безопасным для приема в пищу. Тем не менее, BBI является компонентом соевого белка и соевого молока, утвержденных FDA (агентство США «Управление продовольствием и медикаментами») в перечне продуктов для здорового образа жизни. Вообще соевые белки широко используются в пищу человеком в различных формах, в том числе детских смесях, муке, белковых концентратах, белковых изолятах соевом соусе, текстурированных соевых волокон и тофу. Получение очищенного BBI связано с большими затратами. Поэтому, несмотря на большие масштабы производства сои в мире, а также низкую стоимость сырой сои, использование коммерческих препаратов на основе BBI на сегодняшний день по-прежнему является дорогим. Эту проблему пытаются решать биоинженеры.

2.5. Соевый ингибитор трипсина типа Кюнитца

Ингибитор трипсина типа Кюнитца был обнаружен в 1938 году в бобах сои *Glycine max* Боуманом, и позднее в 1945 году выделен из них Кюнитцом путем кристаллизации. Синонимы: Soybean Basis Trypsin Inhibitor (SBTI),

Soybean Trypsin Inhibitor (STI). На сегодняшний день известно, что в бобах сои содержится несколько полиморфных типов данного белка (Wang K.J. et al., 2008). Ингибитор трипсина Кюнитца из соевых бобов (далее СИТ, или соевый ингибитор) относится к белкам глобулярного типа. Гомологичные ему белки (более 500 белков) образуют семейство ингибиторов, обнаруженных на сегодняшний день в организмах многих растений и животных. Молекулярная масса СИТ составляет 20093.61 атомных единиц массы. Активность соевого ингибитора выражают в разных единицах в зависимости от метода определения активности белка. Один из вариантов это ингибиторные единицы. 1 ИЕ тормозит 1 единицу трипсина, которая расщепляет 1 мкмоль БАЭЭ (N-бензоил-L-аргинина этиловый эфир) в минуту при 25° С и рН 7.6. Изоэлектрическая точка 4.5.

Первичная структура ингибитора представлена одноцепочечным полипептидом из 181 аминокислотного остатка (рис. 17).

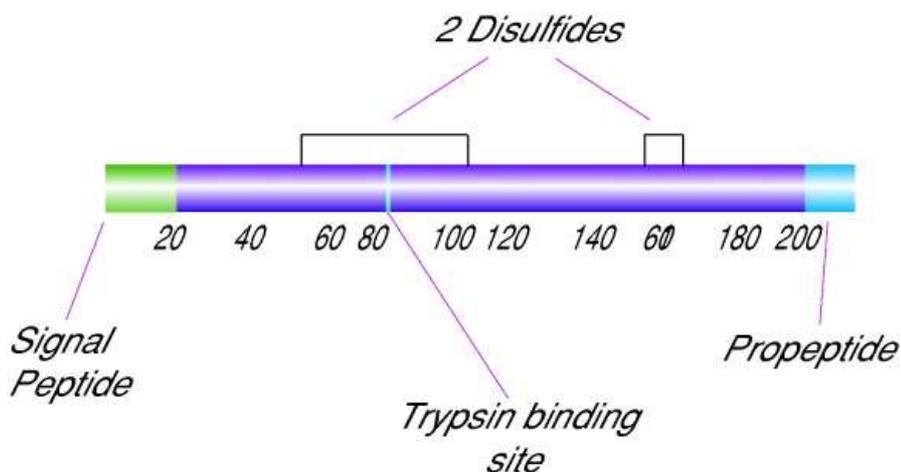
```

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- tyr
161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176

```

a)

Trypsin Inhibitor (Kunitz) (soybean)



б)

Рис. 17. Аминокислотная последовательность соевого ингибитора (а) и доменная структура полипептидной цепи его предшественника (б) (www.sigmaaldrich.com).

Дисульфидные мостики образованы между остатками аминокислот 39 и 86, 136 и 145. Активный центр (аминокислоты 63 и 64) обведен черной линией.

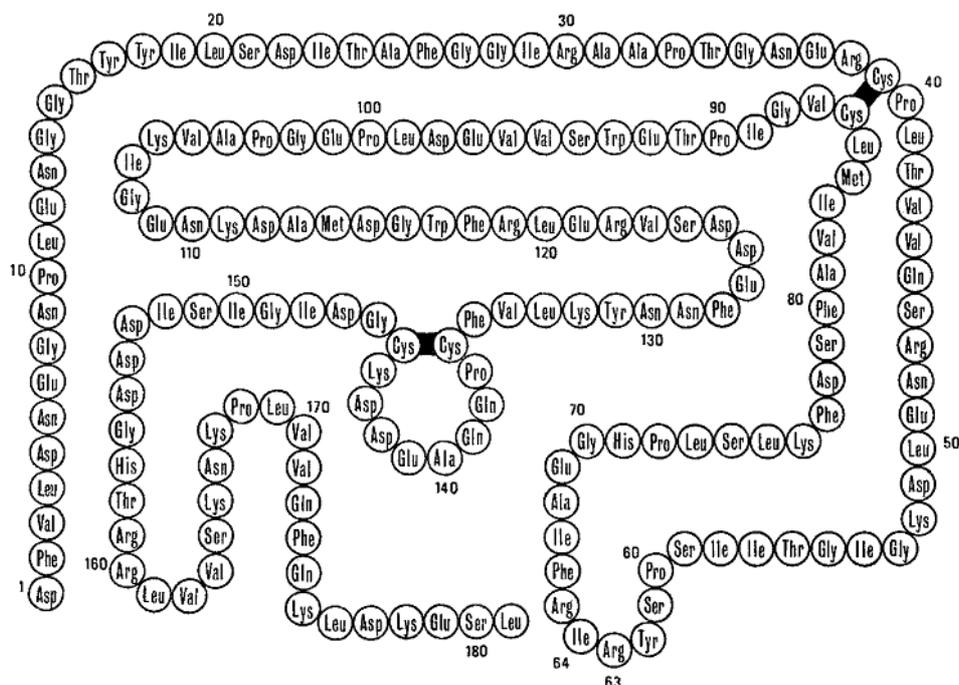


Рис. 18. Дисульфидные связи в молекуле соевого ингибитора (Koide Т., Ikenaka Т., 1973).

На уровне третичной организации в молекуле СИТ образуются две дисульфидные связи: Cys39-Cys86, Cys136-Cys145. Трехмерные модели третичной структуры СИТ изображены на рис. 12. СИТ имеет один активный центр, состоящий из аргинина (положение в цепи 63) и изолейцина (положение в цепи 64), и располагающийся рядом центр связывания.

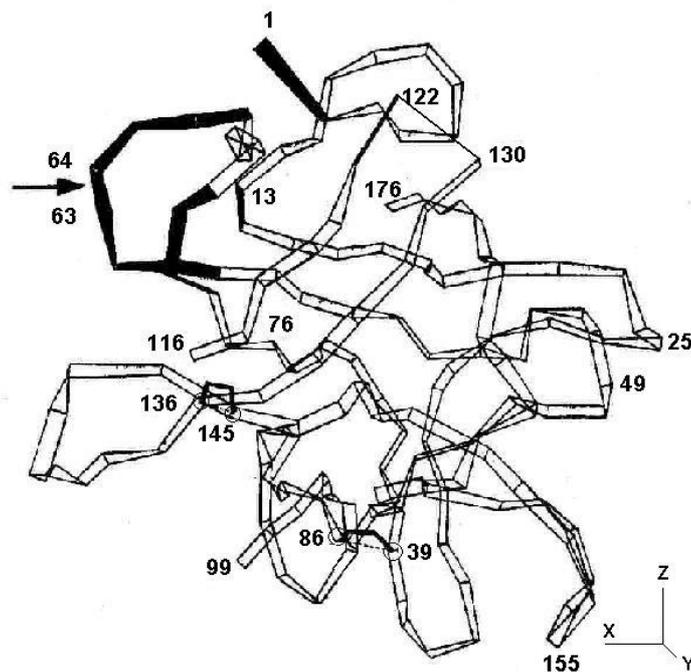


Рис. 19. Дисульфидные связи в молекуле СИТ (Blow D. et al., 1974).

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.

СИТ тормозит активность трипсина, в меньшей степени химотрипсина, плазмина, калликреина плазмы (не влияет на тканевый калликреин), фактора свертывания Ха (Sigma, 2006), энтеропептидазы (Остапченко В.Г., 2006), сериновых протеаз насекомых (Franco O.L. et al., 2004; Sagili R.R. et al., 2005). Не препятствует работе кислых, или тиопротеаз.

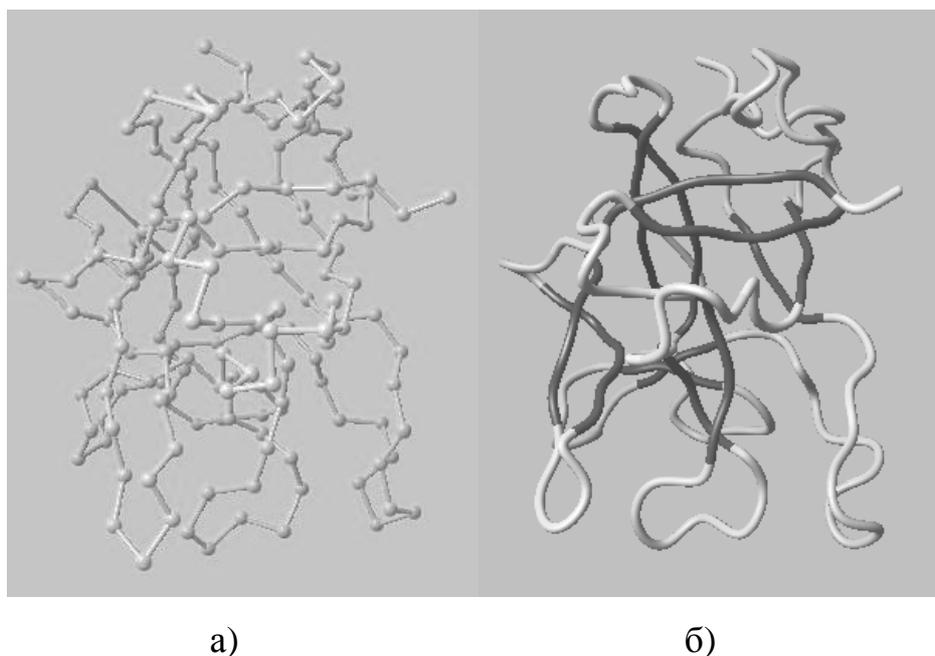


Рис. 20. Трехмерные модели третичной структуры полипептидной цепи СИТ:
 а) шаростержневая модель; б) трубчатая модель.

СИТ образует с протеазами как обратимые, так и необратимые стехиометрические комплексы (1:1). Ингибирование является рН-зависимым (оптимальное рН для связывания трипсина равно 8). Механизм действия СИТ до конца не ясен и его продолжают исследовать. В одном из таких исследований, проведенного А.И. Арчаковым и соавторами (2005), установлено, что с повышением температуры константа скорости ассоциации комплекса трипсин-СИТ возрастает, а диссоциации – не изменяется.

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 H. et al., 2005a, 2005b, 2005c). СИТ в большом количестве содержится в соевых бобах, которые используются для изготовления различных продуктов питания. Поэтому воздействие употребления соевых продуктов привлекает в научном сообществе много внимания. На возможность всасывания СИТ в желудочно-кишечном тракте и его поступления в кровоток указывают работы А.Р. Kennedy (1998). Е.А.

Бородиным и соавторами (2003), показано, что у здоровых людей принимающих соевые коктейли в течение двух недель, происходит снижение общей протеолитической активности сыворотки крови с $0,287 \pm 0,022$ до $0,226 \pm 0,019$ Е/л, согласующееся с всасыванием ингибиторов трипсина из ЖКТ, и коррелирует с увеличением содержания общего белка с $71,1 \pm 1,56$ до $76,8 \pm 1,52$ г/л ($p < 0,02$). Продукты из сои применяют в диетотерапии. Среди диетических белков, соевый белок считается полноценным, так как содержит все незаменимые аминокислоты (Velasquez M.T. et al., 2007). Эпидемиологические исследования показывают, что соевое питание снижает инцидентность некоторых хронических болезней (Xiao C.W., 2008). Употребление сои снижает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, рака груди и простаты (Mořa M. et al., 2007), ожирения, остеопороза (Sakai T. et al., 2008), болезни почек (Anderson J.W., 2008), смягчает течение менопаузы (Kurzer M.S., 2008; Rudkowska I., 2008). Однако, роль соевого ингибитора Кюнитца в данных процессах малоизученна.

Этот белок сегодня не имеет клинического применения, однако его выпускают как реагент для научных лабораторий. Что касается фармацевтического и биотехнологического применения, то соевый ингибитор трипсина используют в качестве антигена ингаляционных и пищевых аллергенов (Quirce et al., 2002). В частности, в одном из исследований у 20-30 % пекарей с астмой или ринитом, работающих с соевой мукой, было обнаружено повышенное содержание конкретных антител. В другом исследовании группы пекарей (14 человек) с выраженными дыхательными симптомами предположили, что липоксидаза и соевый ингибитор трипсина типа Кюнитца являются основными аллергенами соевых бобов. Хотя и были обнаружены специфические антитела IgE к соевому ингибитору реакции бронхов на данный белок показано не было. Дополнительный эксперимент при участии 2-х пекарей в возрасте до 40 лет с диагнозом профессиональной астмы, имеющими контакт с соевой мукой,

показал, что ингаляции чистым соевым ингибитором вызывают ранний астматический ответ (кожные реакции и IgE ответ).

Глава 3. СРАВНЕНИЕ СВОЙСТВ АПРОТИНИНА И СОЕВОГО ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА

3.1. Исследование апротинина и соевого ингибитора *in silico*

В Интернете было просмотрено около 50 электронных баз данных белков, из которых 9 содержат информацию об апротинине и СИТ. Из них следует отметить базы PDB (Protein Data Bank) и UniProt/Swiss-Prot как наиболее информативные. Для компьютерного моделирования апротинина и СИТ были использованы версии программ BioEdit, ChemOffice, Yasara, ISIS, PASS, а также интернет-сервер BLAST, находящихся в свободном доступе.

Таблица 5

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

База данных	Идентификационный код в базе	
	Апротинин	СИТ
UniProt-Swiss-Prot http://www.expasy.org	BPT1_BOVIN (P00974)	ITRA_SOYBN (P01070)
Blocks - most highly conserved regions of proteins http://www.ebi.ac.uk	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	btau0:ENSBTAG00000 017328	?atha0:At1g1786 0.1
iProClass - an integrated, comprehensive and annotated Protein Classification database http://pir.georgetown.edu	P00974/BPT1_BOVIN; PIRSF001621	-
LIGAND - LIGAND chemical database for enzyme reactions http://www.pasteur.fr	50059016; 3809839; bta:616039; 100156830; Bt.32343;BPT1_BOVIN	-

MMDB - Molecular Modeling Data Base http://www.ncbi.nlm.nih.gov	P00974 (Precursor); 1QLQ	1AVU
PDB - Protein Data Bank http://www.rcsb.org	1OA6	1AVU; 1BA7
MEROPS (peptidases) http://merops.sanger.ac.uk	I02.001	I03.001

Гомология первичной структуры

Степень гомологии апротинина и СИТ, вычисленная методом множественного попарного выравнивания последовательностей при помощи программы Bio Edit 5.0.9 составляет 10% (рис. 21 и 22). Низкое сходство объясняется отличием в длине полипептидных цепей ингибиторов (апротинин содержит 58 аминокислотных остатков, СИТ – 181 остаток).

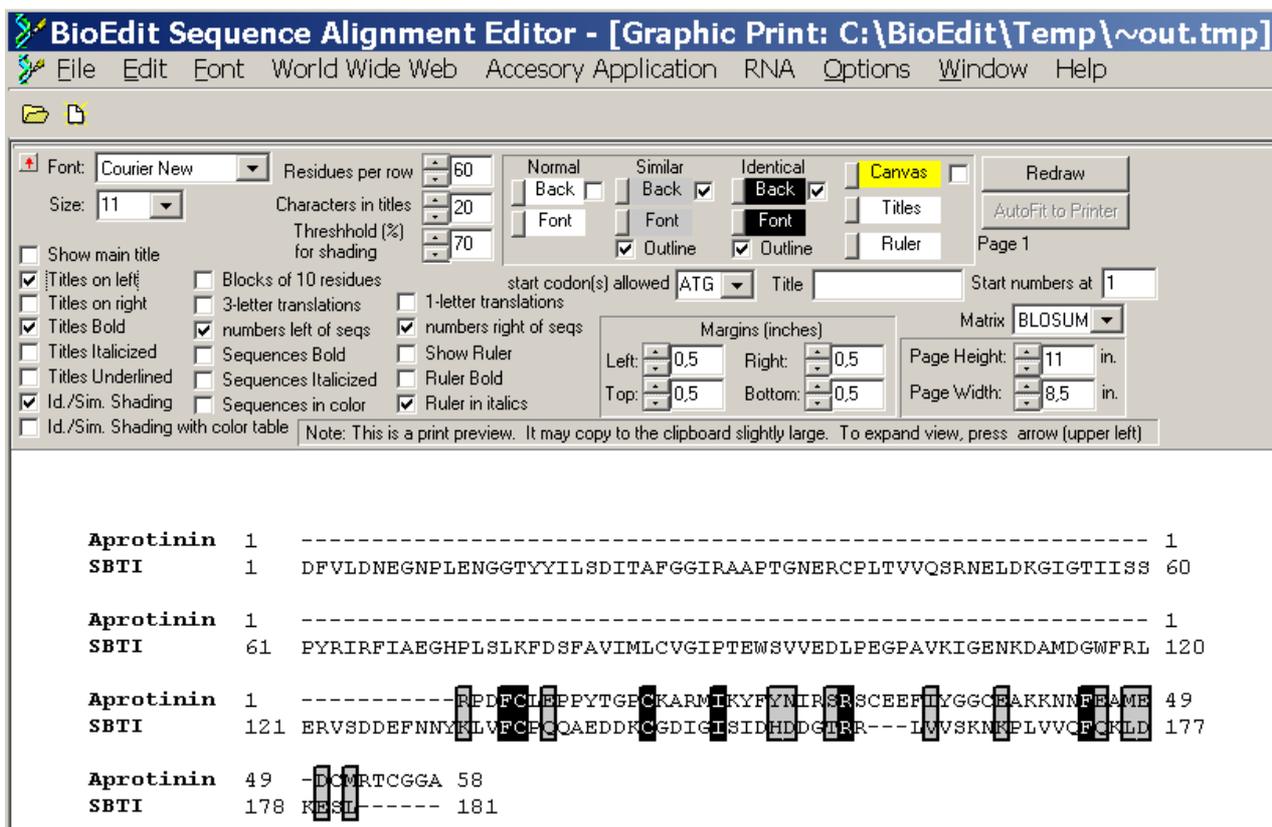


Рис. 21. Рабочее окно программы Bio Edit 5.0.9 с результатом подсчета гомологии апротинина (Apronin) и соевого ингибитора трипсина (SBTI).

Черным цветом обведены идентичные аминокислоты, серым – химически подобные. Аминокислотная последовательность зашифровывается согласно следующим правилам формата FASTA (смотри Приложение 2).

Определение степени гомологии через интернет-сервер BLAST подтвердило, что исследуемые ингибиторы не являются схожими.

При сравнении структуры белков можно применять выравнивание их отдельных фрагментов. Поэтому, нами была предпринята попытка сравнения гомологичности отдельных участков соевого ингибитора и апротинина. Отдельные аминокислотные области белков имеют более высокий уровень гомологии. Так, гомология N-концевой области СИТ (участок цепи 5-60) и апротинина без 2-х крайних N-концевых аминокислот составляет 21%. Центральная область СИТ (участок цепи 85-116) и участок цепи апротинина 25-56 схожи 24%. Наиболее гомологичными (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. 16).

Aprotinin	1	~RDFC	LEPPY	TG	PCKAR	MIKYFY	NIRSR	SCEEF	TYGG	CEAK	KNMFE	AMED	CM	RTCG	GA	58
SBTI	1	DFVLD	NEGM	PLENG	STYY	ILSD	ITAF	GGIR	AAPT	GNERC	PLTV	VCSR	NELDK	IG	TLIS	60
Aprotinin	1	RDFC	LEPPY	TG	PCKAR	MIKYFY	NIRSR	SCEEF	TYGG	CEAK	KNMFE	AMED	CM	RTCG	GA	58
SBTI	61	PYRIR	FIAE	GHPL	SLKFD	SFAV	IMLC	VGIP	TEMS	VVED	LEEG	PAVK	IGEN	KDAM	DGW	120
Aprotinin	1	RDFC	LEPPY	TG	PCKAR	MIKYFY	NIRSR	SCEEF	TYGG	CEAK	KNMFE	AMED	CM	RTCG	GA	58
SBTI	132	KL	VFCF	QA	EDDK	GDIG	LSID	HDDG	TRR	---	LV	SKM	PL	VV	CF	181

Рис. 22. Рабочее окно программы Bio Edit 5.0.9 с результатом определения гомологичных областей полипептидных цепей апротинина (Aprotinin) и соевого ингибитора трипсина (SBTI).

Черным цветом обозначены идентичные аминокислоты, серым – химически подобные.

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 соевый ингибитор как частично структурно подобные белки.

Третичные структуры

В тестировании, изучении функций, модификации, исследовании механизма действия белковых структур большую ценность представляет их трехмерная структура (Blundell T.L. et al., 2006; Silveira N.J. et al., 2007). Для построения и визуализации электронных пространственных структур апротинина и СИТ мы использовали программы Chem Office 5.0 и Yasara 6.2.5. В программу Chem Office 5.0 вводили файлы формата MOL, содержащие информацию о химической структуре первичных последовательностей ингибиторов, и конвертировали в формат PDB. Полученные файлы формата PDB вводили в программу Yasara 6.2.5. Результаты построения электронных трехмерных структур исследуемых ингибиторов отображены на рисунке 23.

Полученные электронные пространственные структуры апротинина и СИТ мы планировали использовать для определения их гомологии на уровне третичной организации белков, а также поиска потенциальных молекулярных 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.

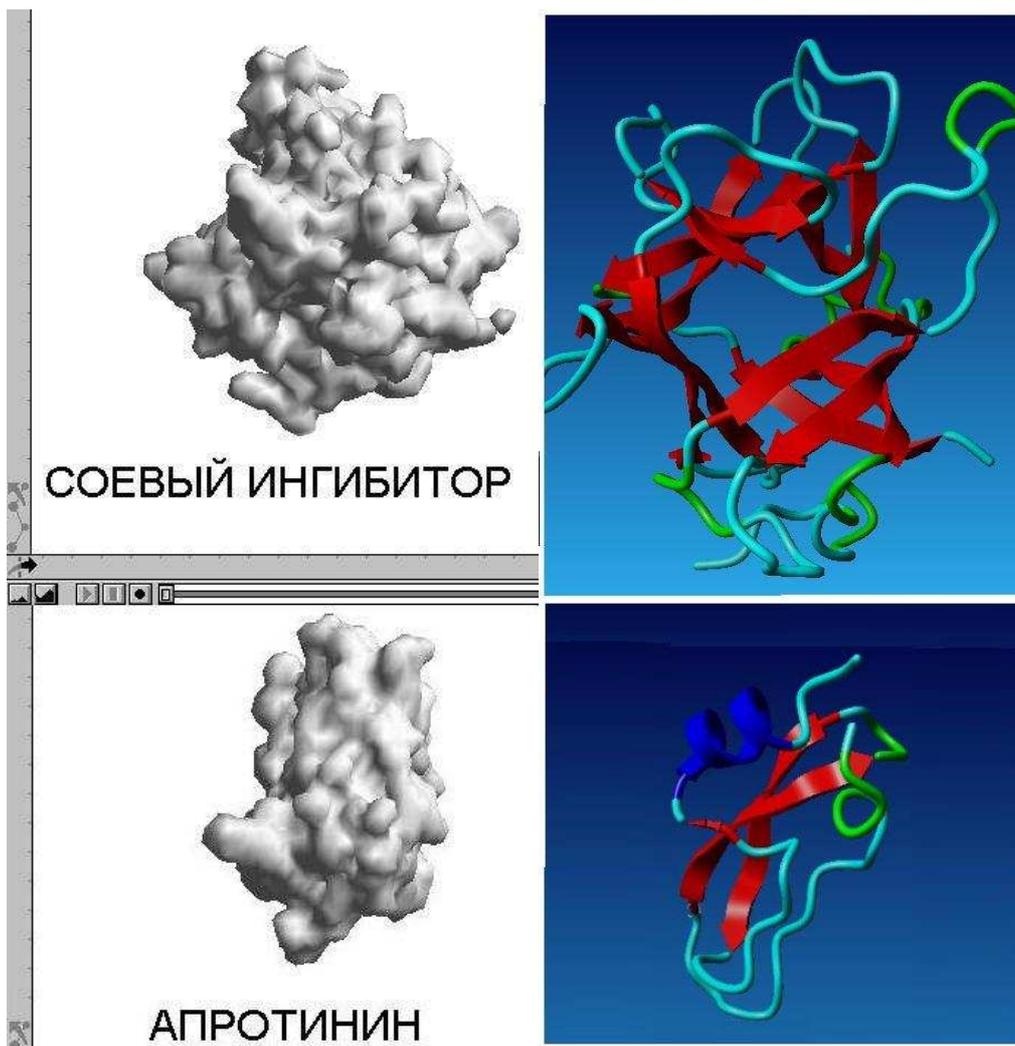


Рис. 23. Электронные трехмерные модели третичных структур аprotинина и СИТ.

Слева показаны модели молекул в виде тел с единой внешней поверхностью (Chem Office 5.0), справа – модели в виде трубок и лент, показывающие «скелет» полипептидной цепи (Yasara 6.2.5).

Спектр биологической активности

При помощи программы PASS выявлено 4 вида потенциальной активности для аprotинина и 3 для соевого ингибитора (рис. 24). По трем видам биологической активности ингибиторы оказались схожи. Так, они являются ингибиторами ренина, ангиотензин-превращающего и эндотелин-

превращающего ферментов. Кроме того, возможность проявления (drug-likeness), перечисленных эффектов, одинакова у обеих молекул. Согласно программе, аprotинин, также является ингибитором нейтральной эндопептидазы. Для всех определенных видов активности критерий P_a (вероятность наличия активности) выше критерия P_i (вероятность отсутствия активности).

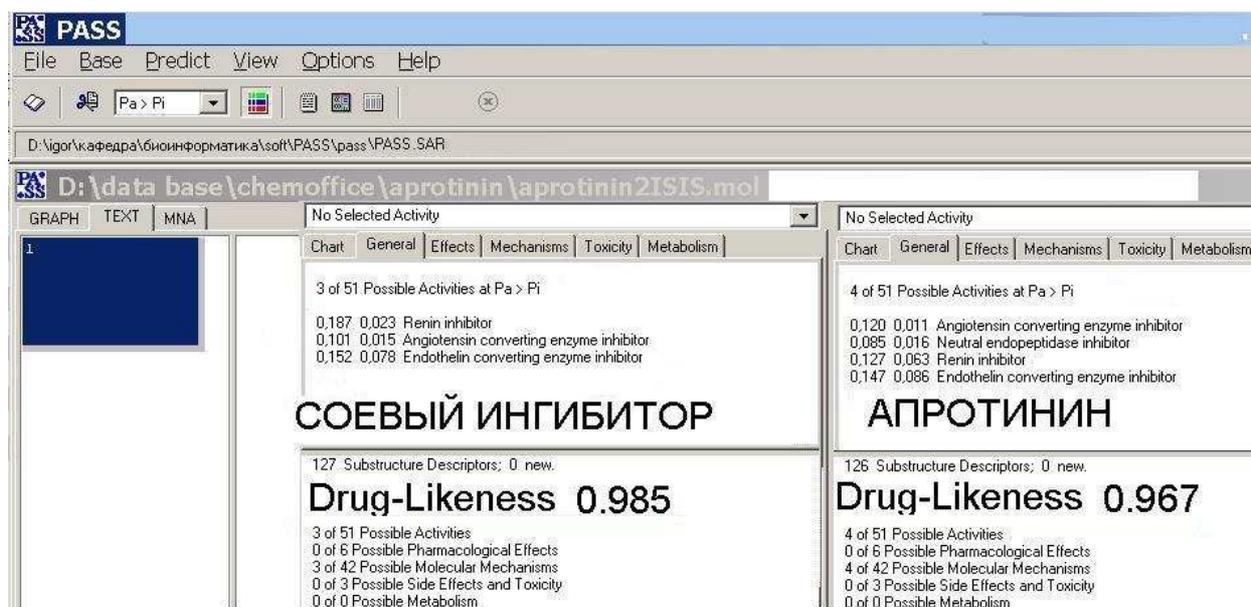


Рис. 24. Результаты определения спектра потенциальной биологической активности аprotинина и СИТ программой PASS:

«Drug-Likeness» – вероятность проявления эффекта; P_a – вероятность наличия активности; P_i – вероятность отсутствия активности. Средняя точность прогноза составляет свыше 85% (из инструкции к программе).

В литературе мы не встретили прямого подтверждения способности аprotинина и соевого ингибитора 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).

Кроме этого программа показала, что оба ингибитора не обладают токсичностью, мутагенностью, канцерогенностью и тератогенностью. Сообщений о подобных эффектах панкреатического и соевого ингибиторов в литературе нам также не встречалось. Поэтому, учитывая, что разработчики программы PASS указывают достоверность данных более 80%, полученные нами результаты косвенно свидетельствуют об однотипности биологического действия апротинина и СИТ.

3.2. Трипсин-ингибиторная активность апротинина и соевого ингибитора *in vitro*

Показатели трипсин-ингибиторной активности (отражает степень ингибирования БАЭЭ-эстеразной активности трипсина по Нартиковой В.Ф., 1977) апротинина («Контрикал») и СИТ приведены на рисунке 25. Для сравнения здесь же приводятся значения трипсин-ингибиторной активности двух низкомолекулярных ингибиторов.

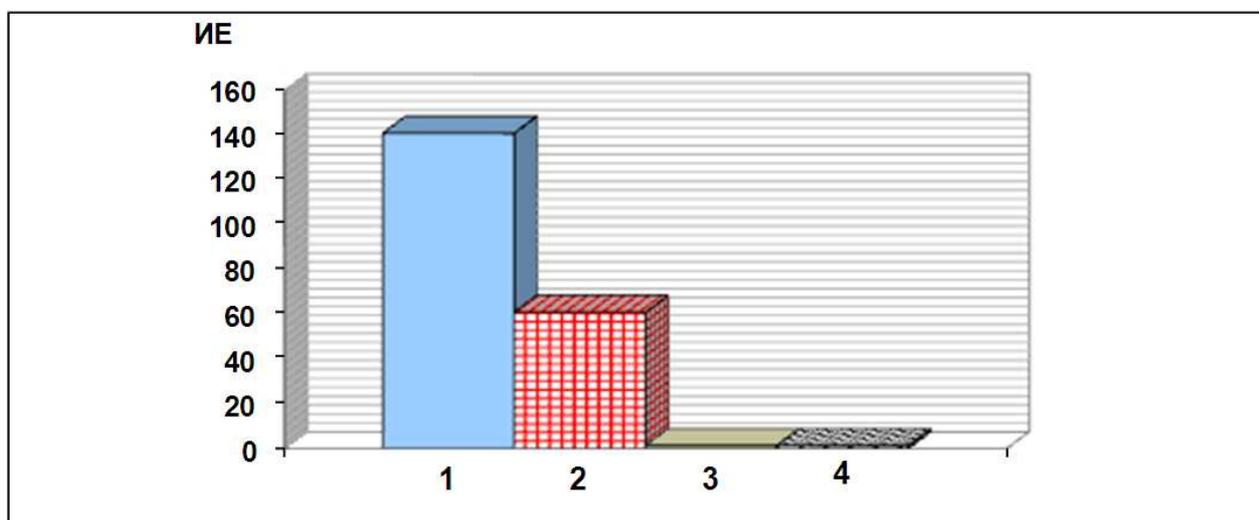


Рис. 25. Трипсин-ингибиторная активность апротинина (1), соевого ингибитора трипсина (2), ε-аминокапроновой кислоты (3) и D-лизина (4).

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

При расчете трипсин-ингибиторной активности на единицу массы ингибитора она снижается в ряду: апротинин (141,1±13,3 ИЕ/мг), соевый

ингибитор ($61,4 \pm 0,9$ ИЕ/мг), ϵ -аминокапроновая кислота ($1,36 \pm 0,04$ ИЕ/мг), D-лизин ($1,31 \pm 0,02$ ИЕ/мг). Таким образом, трипсин ингибиторная активность апротинина при данном способе расчета более чем в 2 раза выше таковой 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.

Молекулярная масса соевого ингибитора (20 100) в 3 раза выше молекулярной массы апротинина (6 514). Поэтому, при расчете на моль ингибитора трипсин-ингибиторная активность соевого ингибитора несколько выше, чем у апротинина (рис. 26). Очевидно, что ингибиторная активность низкомолекулярных ингибиторов при расчете на моль вещества будет ничтожно мала.

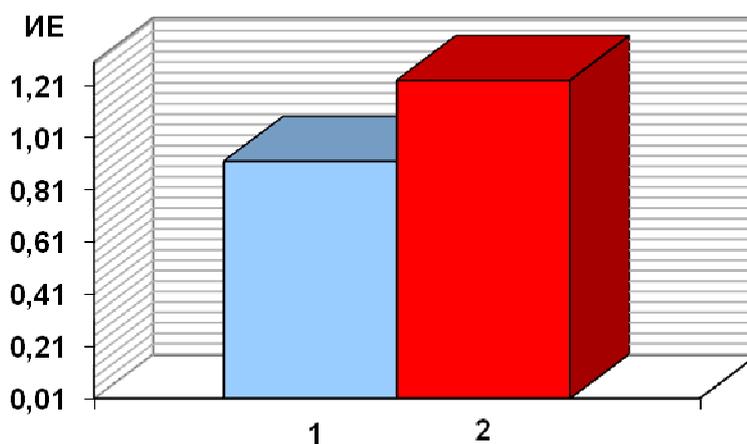


Рис. 26. Трипсин-ингибиторная активность апротинина (1) и соевого ингибитора трипсина (2) в ингибиторных единицах (ИЕ) на 1 нмоль вещества.

3.3. Влияние апротинина и соевого ингибитора на систему гемостаза *in vitro*

Показано, что апротинин и СИТ, в целом, замедляют свертывание крови и фибринолиз, а трипсин оказывает противоположный ингибиторам эффект.

Результаты исследования свертывания крови и фибринолиза приведены в таблице 6.

Таблица 6

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% р-р апротинина (3)	Плазма + 1% 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

П р и м е ч а н и е. * – в некоторых пробах наблюдалось слабое помутнение через 300 секунд.

Коагуляционный гемостаз

Протромбиновое время свертывания крови

Установлено, что протромбиновое время свертывания крови человека в условиях *in vitro*: незначительно возрастает (не более 5%) при воздействии 1% раствором апротинина; возрастает на 50-55% при воздействии 1% раствором соевого ингибитора.

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. 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 ещё работы Г.В. Андрееенко 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.

Активированное частичное тромбопластиновое время свертывания крови

Установлено, что АЧТВ свертывания человеческой плазмы крови в условиях *in vitro*: возрастает на 210% (в 3,2 раза) при воздействии 1% раствором апротинина; возрастает на 190% (в 3 раза) при воздействии 1% раствором СИТ.

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. Андреевко и Б.А. Кудряшов (1961а). 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; Nettis 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.

Тромбиновое время свертывания крови

Образование фибрина под действием тромбина в плазме крови человека в условиях *in vitro*: замедляется на 50% в присутствии 1% раствора апротинина; не происходит в присутствии 1% раствора СИТ. Метод определения тромбинового времени характеризует заключительный этап свертывания, участниками которого являются фибриноген и тромбин.

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.

Система фибринолиза

Фактор XII-калликреинзависимый фибринолиз в плазме крови в условиях *in vitro*: не протекает при воздействии 1%-х растворов апротинина и соевого ингибитора. 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. Функциональную активность тканевого активатора плазминогена, урокиназы, плазмينا и других протеаз могут подавлять α_2 -АП, α_2 -МГ, α_1 -АТ и антитромбин III (Поддорольская 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 плазмينا человека (Доценко и соавт., 1990), а апротинин снижает повышенный уровень фибринолиза, связанный с аномалиями свертывания крови у людей (Kockar et al., 2005). Ингибирование плазмينا 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 согласуются с установленным нами действием апротинина и СИТ на лизис эуглобулинового сгустка.

Тромбоцитарный гемостаз

Агрегация тромбоцитов

В ходе исследования установлено, что апротинин и СИТ тормозят процесс агрегации тромбоцитов *in vitro* (табл. 7).

Таблица 7

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

	Плазма + (контроль) (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	55±4,7	65±15
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	70±9	80±10
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	320±9,3	310±9,2
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	410±9,3	210±26,4
Двухфазная (адреналин)				
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	125±13,1	130±9,3
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	430±18	435±16,2

П р и м е ч а н и е. МА – максимальный уровень агрегации (процент светопропускания), T_{МА} – время достижения максимального уровня агрегации в секундах.

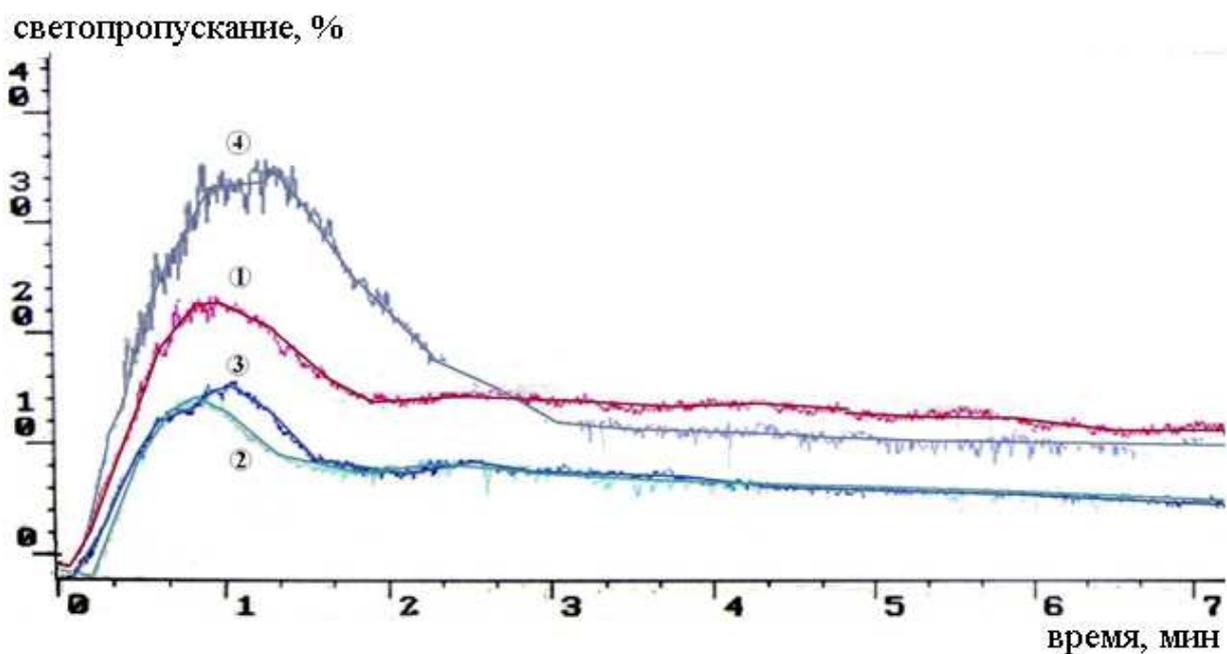


Рис. 28. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ, трипсина на АДФ-иницируемую обратимую (однофазную) агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 5 мкмоль).

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

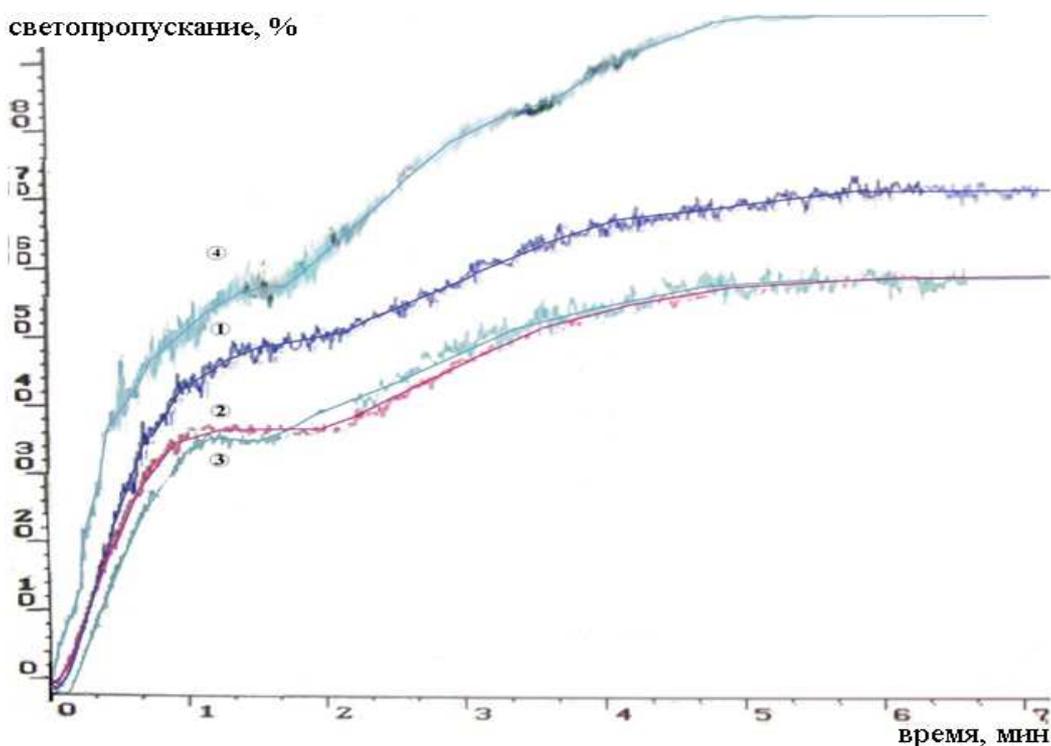


Рис. 29. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на АДФ-иницируемую двухфазную агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 15 мкмоль). 1 – контроль; 2 – апротинин 1%; 3 – СИТ 1%; 4 – трипсин 0,1%.

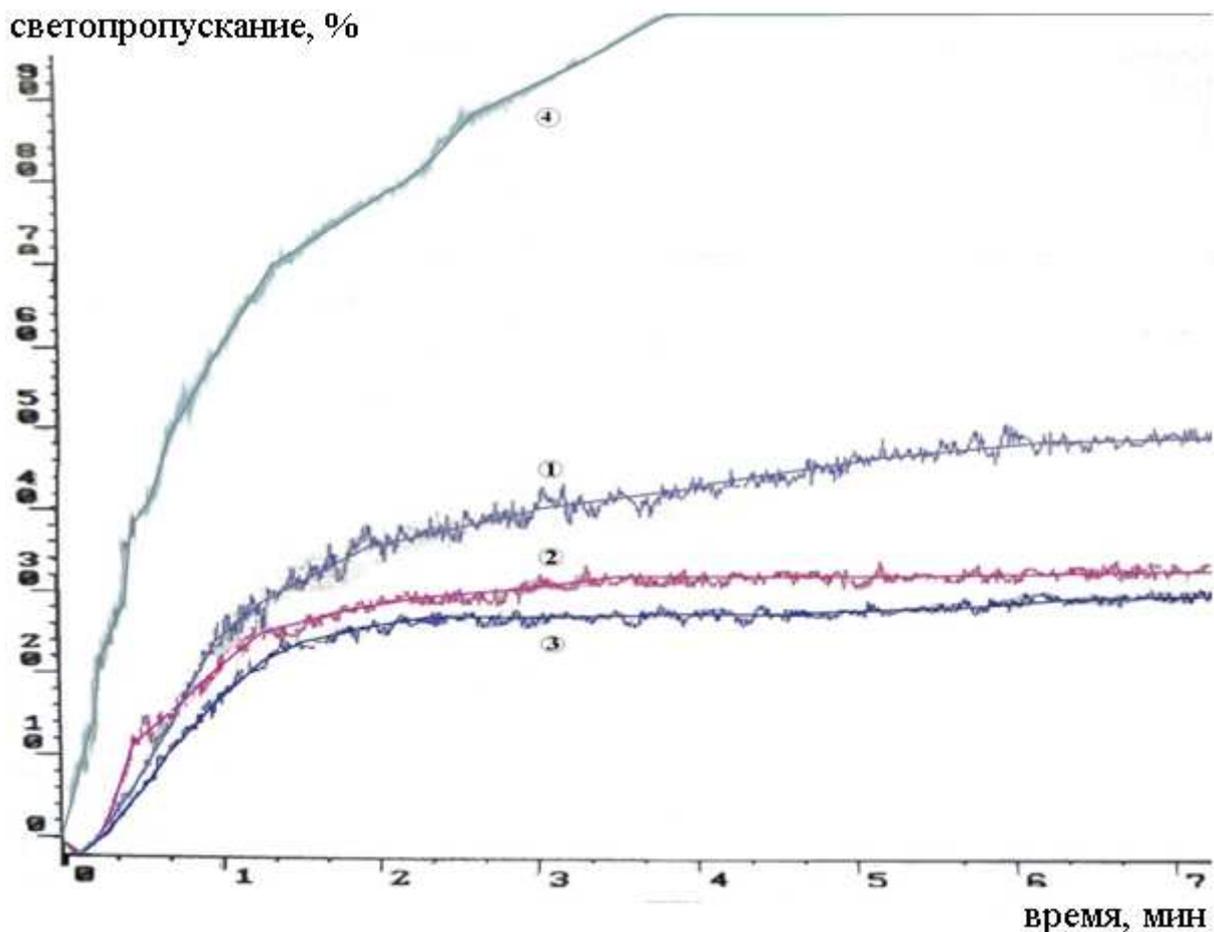


Рис. 30. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на АДФ-иницируемую необратимую агрегацию тромбоцитов *in vitro* (АДФ 25 мкмоль).

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

Установлено, что степень агрегации тромбоцитов при обратимой, двухфазной и необратимой АДФ-иницируемых агрегациях *in vitro*: выражено снижается при воздействии 1%-х растворов апротинина и соевого ингибитора. Сила влияния ингибиторов оказалась одинакова в случае с обратимой и двухфазной агрегациях, а в случае с необратимой агрегацией степень влияния СИТ незначительно выше, чем у апротинина.

светопропускание, %

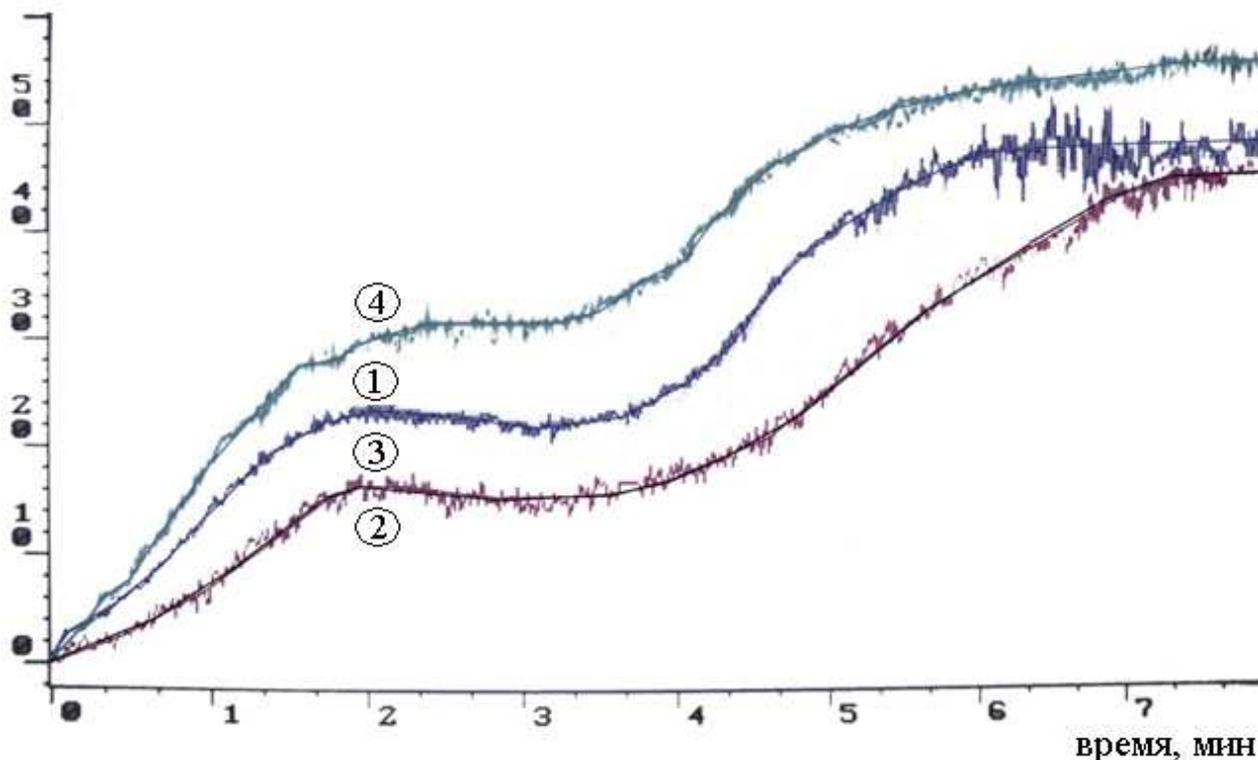


Рис. 31. Типичные агрегатограммы влияния апротинина, СИТ и трипсина на адреналин-иницируемую двухфазную агрегацию *in vitro* (адреналина 25 мкмоль).

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

Установлено, что степень агрегации тромбоцитов адреналин-иницируемой двухфазной агрегации выражено и в равной степени снижается в первую фазу агрегации при воздействии 1% раствора апротинина или 1% СИТ.

Сила влияния ингибиторов оказалась одинакова в случае с обратимой, двухфазной АДФ-иницируемых и двухфазной адреналин-иницируемой агрегациях, а в случае с необратимой АДФ-иницируемой агрегацией степень влияния СИТ незначительно выше, чем у апротинина. Следует отметить, что адреналин-иницируемой агрегации не предшествует набухание тромбоцитов, поэтому фазу набухания на всех контрольных и опытных агрегатограммах не прослеживали.

На обнаруженные нами антиагрегационные свойства апротинина 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.

3.4. Влияние апротинина и соевого ингибитора на систему комплемента *in vitro*

О влиянии апротинина и СИТ на систему комплемента судили по скорости гемолиза эритроцитов барана в присутствии комплемента. О процессе гемолиза судили по его скорости и степени. Результаты исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8

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%) (2)	3,2±0,15 P ₁₋₂ >0,05	7,25±0,25 P ₁₋₂ >0,05
СИТ (1%) (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 $3,5 \pm 0,5$ минуты, а общее время (включая лагфазы) гемолиза – $8,5 \pm 1,5$ минут. В присутствии ингибиторов исследуемые показатели гемолиза (время лагфазы и общее время гемолиза) регистрировались в диапазоне контрольных значений. В пробах с 0,01, 0,1 и 1%-ми растворами апротинина и СИТ лагфаза длилась $3,2 \pm 0,15$ минуты, а общее время гемолиза составляло $7,25 \pm 0,25$ минут. Оба ингибитора не повлияли на скорость гемолиза (рис. 32).

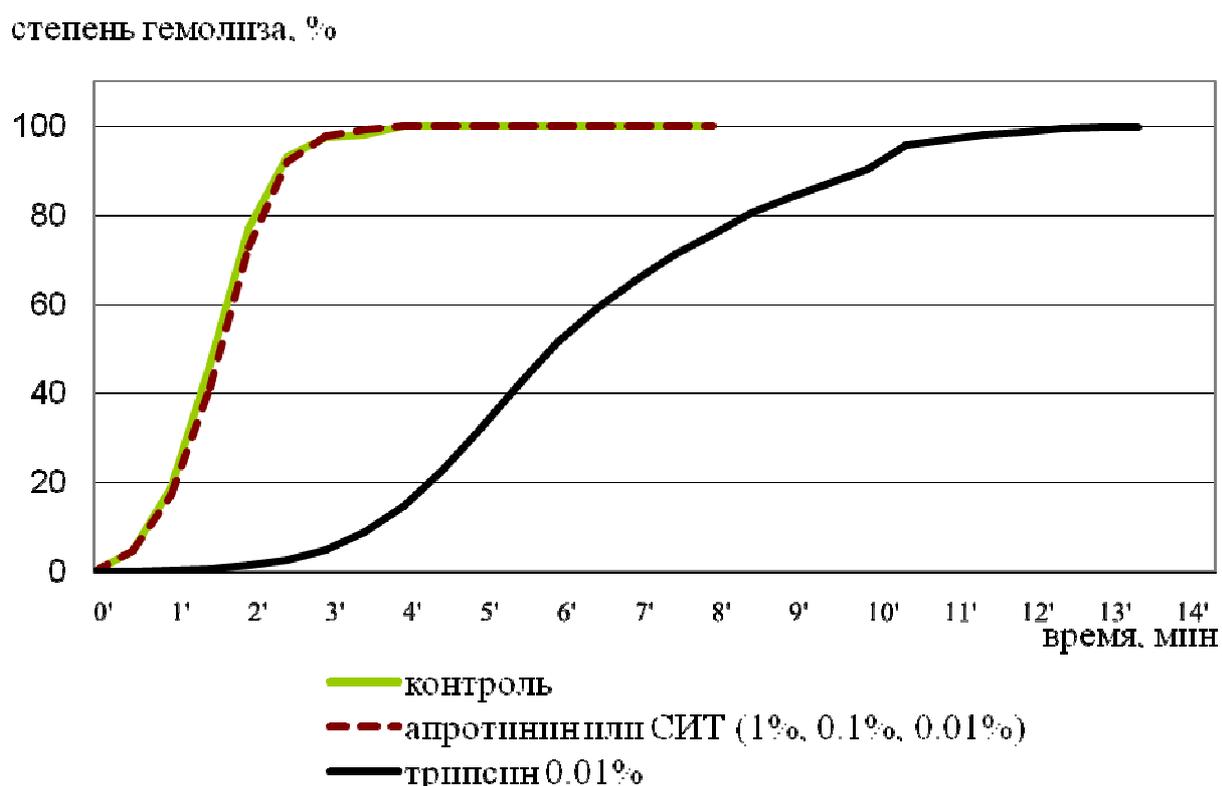


Рис. 32. Типичные кривые влияния апротинина, соевого ингибитора трипсина (СИТ) и трипсина на гемолитическую активность комплемента *in vitro* (лагфаза не показана).

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 увеличат время гемолитического распада. Однако результаты эксперимента не показали изменений скорости гемолиза при действии апротинина и СИТ. Такой эффект ингибиторов можно объяснить их специфичностью.

Внесение трипсина замедляло гемолиз. Скорость гемолиза менялась в зависимости от концентрации трипсина (рис. 33). При инкубировании комплемента с 0,001% раствором трипсина лагфаза гемолиза длилась $4,25 \pm 0,25$ минуты, общее время гемолиза составляло $11,5 \pm 0,5$ минут, с 0,01% раствором лагфаза протекала $4,25 \pm 0,25$ минуты, а общее время составило $15,5 \pm 16$ минут, с 0,1% раствором гемолиз был полностью блокирован.

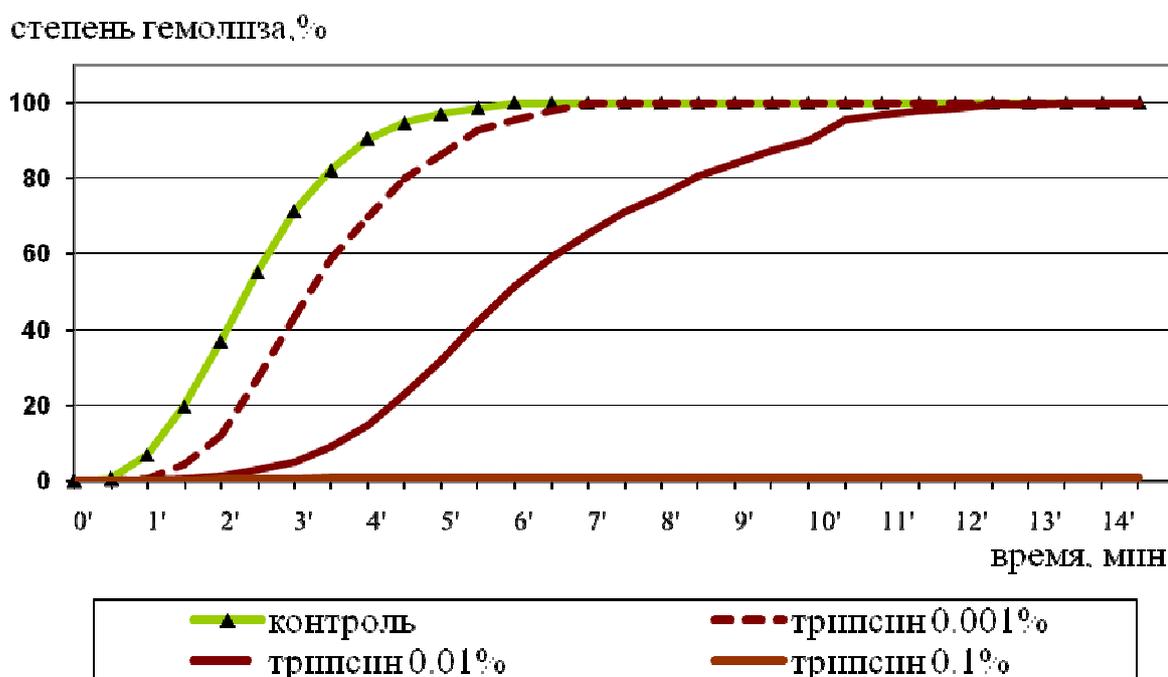


Рис. 33. Типичные кривые влияния трипсина на гемолитическую активность комплемента *in vitro* (лагфаза не показана).

Трипсин угнетает гемолитическую активность системы комплемента, возможно, потому что компоненты комплемента подверглись протеолитическому распаду под действием трипсина. В литературе было найдено подтверждение данного предположения. Бельтюков П.П. и соавторы (2003), установили, что трипсиноподобный фермент, калликреин ткани,

эффективно гидролизует компонент С3 комплемента человека в условиях *in vitro* снижая активность комплемента. Таким образом, установлено, что скорость гемолиза эритроцитов барана под действием системы комплемента: не изменяется при воздействии апротинина и соевого ингибитора в исследуемых концентрациях.

3.5. Влияние приема изолята соевого белка на показатели протеолиза в сыворотке крови человека

Соя культивируется как продукт питания, оказывающий благоприятное действие на здоровье человека, более 3000 лет (Messina M., 2003; Mořa M. et al., 2007; Bent S., 2008). В последние десятилетия соевые продукты начали использоваться в странах запада и в России в качестве средств диетотерапии при ряде заболеваний (Бородин Е.А. и соавт., 2000; AbuMweis S.S. et al., 2008; Messina M., Messina V., 2008; Retelny V.S. et al., 2008). В частности, нами были показаны гипохолестеринемический (Borodin et al., 2010) и антиоксидантный (Borodin et al., 2009) эффекты от приема соевых продуктов. Некоторые продукты из сои содержат неаллергенный соевый ингибитор Боумана-Бирка, который в 1999 году официально признан компонентом продовольственных продуктов (Losso J.N., 2008). Установлено, что ингибиторы сои, попадая в составе соевых продуктов в желудочно-кишечный тракт, частично могут всасываться (Kennedy A.R., 1998). В рамках исследования протеолиза мы поставили перед собой задачу выяснить, как длительное употребление в пищу продуктов содержащих активные соевые ингибиторы может влиять протеазно-ингибиторную систему организма человека. О влиянии соевого питания на процессы протеолиза судили по общей протеолитической и общей трипсин-ингибиторной активности сыворотки крови. В результате эксперимента общая протеолитическая активность снизилась на фоне увеличения общего уровня

трипсин-ингибиторной активности сыворотки крови. Результаты представлены в таблице 9.

Трипсин-ингибиторная активность изолята соевого белка

По характеристикам указанным производителями изолят содержит более 90% белка. От общей белковой массы сои до 10% приходится на ингибиторы (Моссе Д. и соавт., 1986). В процессе приготовления изолята соя подвергается термической обработке, в ходе которой биологически активные компоненты сои, в том числе белки - ингибиторы протеаз, могут инактивироваться. Известно, что около 20% соевого ингибитора трипсина представляют термостабильную фракцию (Kennedy A.R., 1998). Определение трипсинингибиторной активности изолята соевого белка показало, что 1 мг изолята содержит $1,4 \pm 0,1$ ингибиторных единиц (ИЕ). Для примера 1 мг чистого СИТ обладает активностью равной около 60 ингибиторных единиц. Таким образом, на долю сохранившегося активностью СИТ приходится около 2,7% от общей массы изолята.

Определение общего уровня протеолитической и трипсин-ингибиторной активности в сыворотке крови людей, употреблявших изолят соевого белка

30 взрослых людей в возрасте 35-67 лет без выраженных признаков хронических заболеваний на протяжении 2 месяцев употребляли соевое печенье, с содержанием изолята соевого белка 30% (Vorodin et al., 2009). Кровь для исследований брали до начала и после исследования. В сыворотке крови определяли общую протеолитическую и трипсин-ингибиторную активности. Ежедневный прием участниками исследования 30 грамм соевого изолята соответствует приему около 0,85 грамма активного СИТ (приблизительно 51 850 ИЕ). За весь период исследования каждый участник принял 1,8 кг изолята соевого белка или 50 грамм активного ингибитора. В таблице 9 представлены

данные измерения протеолитической и трипсин-ингибиторной активности сыворотки крови людей до и после приема соевого изолята.

Таблица 9

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

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

Из полученных результатов видно, что прием изолята соевого белка на протяжении 2 месяцев сопровождался достоверным снижением общей протеолитической активности сыворотки крови на 18% (p<0,05) и увеличением трипсин-ингибиторной активности на 21% (p<0,01). Полученные результаты указывают на принципиальную возможность регуляции процессов протеолиза в организме с помощью приема соевых продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение биоинформационного исследования с использованием ряда специализированных компьютерных программ вычислительной биологии показало, что на уровне первичной структуры апротинин и соевый ингибитор трипсина являются низкогомологичными 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 агрегацию тромбоцитов. Данный эффект ингибиторов обнаружен в случае обратимой, двухфазной и необратимой АДФ-инициируемой и двухфазной адреналин-инициируемой типах агрегации. Трипсин, наоборот, увеличивает агрегацию 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 приема изолята соевого белка, содержащего небольшие количества активного СИТ, группой людей на протяжении двух месяцев выявило статистически достоверное увеличение трипсин-ингибиторной активности на фоне снижения общей протеолитической активности сыворотки крови. Эти результаты указывают на возможность регуляции процессов протеолиза в организме с помощью приема продуктов, содержащих ингибиторы протеаз.

В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейших исследований СИТ в качестве возможного фармацевтического средства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. Бельтюков П.П., Галебская 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.
4. Бородин Е.А., Аксенова Т.В., Анищенко Н.И. Пищевые продукты из сои. Новая роль // Вестник ДВО РАН. 2000. № 3. С. 72-85.
5. 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.
6. 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.
7. Гинопдман Л.М. О механизме функционирования пептидогидролаз // Структура и функция протеолитических ферментов: тезисы докладов конференции. Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46, № 5. С. 477.
8. Грицюк Т.Л., Кузнецова Т.А. Компоненты комплемента и иммунные комплексы у онкологических больных // Тихоокеан. мед. журнал. 2005. № 4. С. 17-19.
9. Дементьева И.И., Чарная М.А. и др. Превентивная роль больших доз аprotинина в снижении степени нарушений метаболизма при операциях

- аортокоронарного шунтирования // Анестезиология и реаниматология. 1996. № 1. С. 55-58.
10. Дилакян Э.А., Балаевская Т.О., Закамалдина-Цама Т. Исследование экспрессии катепсинов D и L в процессе онкогенной трансформации фибробластов // Вопр. мед. химии. 1994. Т. 40, № 3. С. 2-6.
 11. 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.
 12. Дюкова Е.В. Активность протеиназ и их ингибиторов при воспалительных заболеваниях кожи: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2004. 20 с.
 13. Ефременко Ю.Р., Конторщикова К.Н. Состояние системы протеолиза в условиях окислительных воздействий на организм // Нижегородский мед. журнал. 2003. № 1. С. 15-21.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Мизулин Ф.Ф. Лекция «Воспаление» // Новосибирск. 1995. Режим доступа: <http://www.5ka/50/10594/1.html> (дата обращения 19.11.2006)
 17. Михайлов И.Б. Клиническая фармакология. Санкт-Петербург: «Фолиант», изд. третье, 2002. 451 с.
 18. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. № 41, С. 3261-282.

19. Моссе Д., Пернолле Д. Химия и биохимия бобовых. Москва: Агропромиздат, 1986. 248 с.
20. Нагорная В.Ф. Роль энзимов в патогенезе опухолей гениталий // Акушерство и гинекология. 1989. № 4. С. 11-15.
21. Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С. Определение антитриптической активности в сыворотке крови человека // Современные методы в биохимии. Под. ред. Орехович В.Н. М.: Медицина, 1977. С.188-191.
22. Пашин В.С., Киридон О.А., Карабаш А.П., Родькин Д.В., Бояркин СВ., Копырин А.А. Оптимизация режима антикоагулянтной терапии у больных с тромбозом глубоких вен в условиях стационара // Тихоокеан. мед. журнал. 2007. № 3. С. 43–44.
23. 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.
24. Пучков К.В., Иванов В.В. Эндовидеохирургия малых проставств: особенности реакции системы гемостаза // Тихоокеан. мед. журнал. 2007. № 4. С. 58-61.
25. Сперанская А.С., Криницына А.А., Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Керученко Я.С., Шевелев А.Б., Валуева Т.А. Гетерологичная экспрессия, очистка и свойства белка-ингибитора сериновых протеиназ из картофеля // Биохимия. 2006. Т. 71, Выпуск 11. С. 1451-1458.
26. Степанов В.М. Современные проблемы физиологии пищеварения // Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. № 1. С. 37-41.
27. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. Под ред. Курганова Б.И. Москва: «Мир», 1980. 432 с.
28. Чилингиоров Р.Х. Влияние ингибиторов протеолиза на некоторые бактериальные возбудители и течение гнойно-воспалительного процесса // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1997. № 3. С. 37-39.

29. 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, Выпуск 4. С. 544-548.
30. Чарная М.А., Дементьева И.И., Использование апротинина при хирургических вмешательствах, сопряженных с высоким риском геморрагических осложнений // Хирургия. 2005. № 11. С. 71-76.
31. Щербак И.Г. Биологическая химия. Уч-к для мед. вузов. Ред. Габалевская Л.В. Изд-во СПбГМУ, 2005. 276 с.
32. AbuMweis S.S., Jones P.J. Cholesterol-lowering effect of plant sterols // Curr. Atheroscler Rep. 2008. Vol. 10, № 6. P. 467-472.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Arbogast H.P. Thrombin: antithrombotic properties and pharmacological consequences // Hamostaseologie. 2004. Vol. 24, № 3. P. 179-190.
37. Bas M., Adams V., Suvorava T., Niehues T., Hoffmann T.K., Kojda G. Nonallergic angioedema: role of bradykinin // Allergy. 2007. Vol. 62, № 8. P. 842-56.
38. Bashir T., Pagano M. Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis // Adv. Cancer. Res. 2003. Vol. 88. P. 101-144.
39. 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.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Birk Y., Gertler A., Khalef S. A pure trypsin inhibitor from soya beans // *Biochem J.* 1963. Vol. 87. P. 281-284.
44. 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.
45. Blundell T.L., Bancinyane L. Sibanda, 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.
46. Borodin E.A., Menshikova I.G., Dorovskikh V.A., Feoktistova N.A., Shtarberg M.A., Yamamoto T., Takamatsu K., Mori H., Yamamoto S. Effects of soy protein isolate and casein on blood lipids and glucose in Russian adults with moderate hyperlipidemia // *J. Nutr. Sci. Vit.* 2009. Vol. 50, No. 6. P. 492-497.
47. Borodin E.A., Menshikova I.G., Dorovskikh V.A., Feoktistova N.A., Shtarberg M.A., Aksenova T.V., Yamamoto T., Takamatsu K., Mori H., Yamamoto S. Antioxidant and Hypocholesterolemic Effects of Soy Foods and Cardiovascular Disease. In: *Soybean and Health.* (Ed.by Hany A. El-Shemy): In-Tech, Croatia, 2011, p. 407-424.
48. Bowman D.E. Differentiation of soy bean antitryptic factors // *Proc Soc Exp Biol Med.* 1946. Vol. 63. P. 547-550.

49. Bracho FA. Hereditary angioedema. *Curr Opin Hematol.* 2005. Vol. 12, № 6. P. 493-508.
50. 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.
51. Casterella P.J., Tchong 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.
52. Chondrogianni N., Gonos E.S. Proteasome activation as a novel antiaging strategy // *IUBMB Life.* 2008. Vol. 60, № 10. P. 651-655.
53. 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.
54. 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.
55. Clemente A., Moreno F.J., Marín-Manzano Mdel C., Jiménez E., Domoney C. The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases // *Mol. Nutr. Food. Res.* 2010. Vol. 54(3). P. 396-405.
56. 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.
57. 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.

58. 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.
59. 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.
60. Dai H, Ciric B, Zhang GX, Rostami A. Bowman-Birk Inhibitor attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by delaying infiltration of inflammatory cells into the CNS // *Immunol Res.* 2011. Vol. 51(2-3). P. 145-152.
61. Davie E.W., Fujikawa K., Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. 10363–10370.
62. 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.
63. 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.
64. Despotis G.J., Filos K.S., Levine V., Alsoufiev A., Spitznagel E. Aprotinin Prolongs Activated and Nonactivated Whole Blood Clotting Time and Potentiates the Effect of Heparin In Vitro // *Anest. Analg.* 1996. Vol. 82. P. 1126-1131.
65. 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.
66. Doherty F.J., Dawson S., Mayer R.J. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis // *J. Essays Biochem.* 2003. Vol. 38, P. 51-63.
67. 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.

68. Duffy B., Bhatt D.L. Antiplatelet agents in patients undergoing percutaneous coronary intervention: how many and how much // *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2005. Vol. 5, № 5. P. 307-318.
69. 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.
70. Edwards D.R., Handsley M.M., Pennington C.J. The ADAM metalloproteinases // *Mol. Aspects Med*. 2008. Vol. 29, № 5. P. 258-289.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Freeman M. Rhomboid proteases and their biological functions // *Annu. Rev. Genet*. 2008. Vol. 42. P. 191-210.
75. 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.
76. 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.
77. Hiemstra P.S. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation // *Biochem. Soc. Trans*. 2002. Vol. 30, № 2. P. 116-120.
78. 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.

79. 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.
80. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles // *J. Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1535, № 3. P. 221-235.
81. 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.
82. Kadowaki M., Kanazawa T. Amino acids as regulators of proteolysis // *J. Nutr.* 2003. Vol. 133, № 6, Suppl. 1. P. 2052S-2056S.
83. 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.
84. Kennedy A.R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as anticarcinogenic agent // *Am. J. Clin. Nutr.* 1998. Vol. 68, № 6. P. 1406-1412.
85. Khan H., Salman K.A., Ahmed S. Alpha-1 antitrypsin deficiency in emphysema // *J. Assoc. Physicians. India.* 2002. Vol. 50. P. 579-582.
86. 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.
87. 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.
88. 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.

89. 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.
90. 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.
91. Koide T., Ikenaka T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 3. Amino-acid sequences of the carboxyl-terminal region and the complete amino-acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). // Eur J Biochem. 1973. Vol. 32(3). P. 417-431.
92. 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.
93. Kurzer M.S. Soy consumption for reduction of menopausal symptoms // Inflammopharmacology. 2008. Vol. 16, № 5. P. 227-229.
94. 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.
95. Lehman S.J., Chew D.P. Bivalirudin in percutaneous coronary intervention // Vasc. Health Risk Manag. 2006. Vol. 2, № 4. P. 357-363.
96. 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.
97. Li J., Ye L., Cook D.R., Wang X., Liu J., Kolson D.L., Persidsky Y, Ho WZ. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages // J. Neuroinflammation. 2011. Vol. 15. P. 8-15.
98. Li W., Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms // Cell Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65, № 15. P. 2397-2406.
99. 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.
100. Lucas A., McFadden G. Secreted immunomodulatory viral proteins as novel biotherapeutics // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173, № 8. P. 4765-4774.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. Messina M., Messina V. Provisional Recommended Soy Protein and Isoflavone Intakes for Healthy Adults: Rationale // *Nutr. Today.* 2003. Vol.38, No.3. P.100-109/
105. Messina M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research // *J. Nutr.* (2010), Vol.140, No.7 (Suppl), pp. 1350S-4S.
106. Meta A., Nakatake H., Imamura T., Nozaki C. High-yield production and characterization of biologically active recombinant aprotinin expressed in *Saccharomyces cerevisiae* // *Protein Expr. Purif.* 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 10.01.2009).
107. 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.
108. Morris C.A., Selsby J.T., Morris L.D., Pendrak K., Sweeney H.L. Bowman-Birk inhibitor attenuates dystrophic pathology in mdx mice // *J. Appl. Physiol.* 2010. Vol. 109(5). P. 1492-1499.
109. Moser M., Bode C. Anticoagulation in acute coronary syndrome. An update // *Hamostaseologie.* 2008. Vol. 28, № 1. P. 62-65.
110. 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.

111. Muszyńska A., Janocha E., Fal A.M. Hereditary angioedema – pathophysiology, genetics, symptoms // *Pol. Merkur. Lekarski*. 2008. Vol. 25, № 145. P. 90-93.
112. Nepomniashchikh T.S., Shchelkunov S.N. Poxviral immunomodulatory proteins as new therapeutics for immunocorrection // *Mol. Biol.* 2008. Vol. 42, № 5. P. 904-912.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. Page M. J., Di Cera E. Serine peptidases: Classification, structure and function // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. Vol. 65. 1220-1236.
118. Palavalli M.H., Natarajan S.S., Wang T.T., Krishnan H.B. Imbibition of Soybean Seeds in Warm Water Results in the Release of Copious Amounts of Bowman-Birk Protease Inhibitor, a Putative Anticarcinogenic Agent // *J Agric Food Chem.* 2012. 28. Epub.
119. Pengo V. New trends in anticoagulant treatments // *Lupus.* 2005. Vol. 14, № 9. P. 789-793.
120. Perona J.J., Craik C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases // *Protein Science.* 1999. Vol. 4, № 3. P. 337-360.
121. Peters J.M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond // *J. Mol. Cell. Molecular Cell.* Vol. 9., № 5. P. 931-943.
122. 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.

123. 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.
124. Puente X.S., Lopez-Otin C.A. Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors // *Genome Res.* 2004. Vol. 14. P. 609-622.
125. Quirce S., Fernandez-Nieto M., Polo F., Sastre J. Soybean trypsin inhibitor is an occupational inhalant allergen // *J Allergy Clin Immunol.* 2002. Vol. 109. P. 178.
126. Radović N., Cucić S., Altarac S. Molecular aspects of apoptosis // *Acta Med. Croatica.* 2008. Vol. 62, № 3. P. 249-256.
127. 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.
128. Rawson R.B. Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus // *J. Essays Biochem.* 2002. Vol. 38, P. 155-168.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. Ricagno S., Caccia S., Sorrentino G., Antonini G., Bolognesi M. Human Neuroserpin: Structure and Time-Dependent Inhibition // *J. Mol. Biol.* 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 10.01.2009).
133. Richardson J., Viswanathan K., Lucas A. Serpins, the vasculature, and viral therapeutics // *Front. Biosci.* 2006. Vol. 1, № 11. P. 1042-1056.
134. Rooijackers S.H., van Strijp J.A. Bacterial complement evasion // *Mol. Immunol.* 2007. Vol. 44, № 1. P. 23-32.

135. 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.
136. Rubin, H. Serine protease inhibitors (SERPINS): where mechanism meets medicine // *Nat. Med.* 1996. 2, P. 632–633.
137. Rudkowska I. Functional foods for cardiovascular disease in women // *Menopause Int.* 2008. Vol. 14, № 2. P. 63-69.
138. Rui-Feng Q., Zhan-Wu S., Cheng-Wu C. Structural Features and Molecular Evolution of Bowman-Birk Protease Inhibitors and Their Potential Application // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005, 37(5): 283–292.
139. 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.
140. Sakai T., Kogiso M. Soy isoflavones and immunity // *J. Med. Invest.* 2008. Vol. 55, № 3. P. 167-173.
141. Sakurai N., Suzuki K., Nagaoka T., Saito T., Yoshimura H., Yano T., Sadzuka Y., Asano R. Connexin 43-dependent tumor-suppressing effect of the Bowman-Birk protease inhibitor on M5076 ovarian sarcoma-bearing mice. *Mol Med Report.* 2008. Vol. 1(5). P. 689-693.
142. Salvesen G.S., Riedl S.J. Caspase mechanisms // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. Vol. 615. P. 13-23.
143. Santos M.M., Moreira R. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors // *Mini Rev. Med. Chem.* 2007. Vol. 7, № 10. P. 1040-1050.
144. 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.
145. 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.
146. Sigma. Catalog reagents and labware. Sigma-Aldrich, Inc. 2006. P.1440.
147. 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.
148. 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.
149. Sim R.B., Tsiftoglou S.A. Proteases of the complement system // *Biochem. Soc. Trans.* 2004. Vol. 32, Pt. 1. P. 21-27.
150. 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.
151. Smith M., Kocher H.M., Hunt B.J. Aprotinin in severe acute pancreatitis // *Int. J. Clin. Pract.* 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 8.01.2009).
152. 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.
153. 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 // *Protein Expr. Purif.* 2009. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (дата обращения 8.01.2009).
154. Suzuki K. The multi-functional serpin, protein C inhibitor: beyond thrombosis and hemostasis // *J. Thromb Haemost.* 2008. Vol. 6, № 12. P. 2017-2026.
155. Tanaka K. The protein-destroying machinery // *Gan To Kagaku Ryoho.* 2008. Vol. 35, № 1. P. 6-10.

156. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 2009. Vol. 85, № 1. P. 12-36.
157. Tang M., Asamoto M., Ogawa K., Naiki-Ito A., Sato S., Takahashi S., Shirai T. Induction of apoptosis in the LNCaP human prostate carcinoma cell line and prostate adenocarcinomas of SV40T antigen transgenic rats by the Bowman-Birk inhibitor // Pathol Int. 2009. Vol. 59(11). P. 790-796.
158. Tirado-Conde G., Lara B., Miravittles M. Augmentation therapy for emphysema due to alpha-1-antitrypsin deficiency // Ther. Adv. Respir Dis. 2008. Vol. 2, № 1. P. 13-21.
159. 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.
160. Velasquez M.T., Bhathena S.J. Role of dietary soy protein in obesity // Int. J. Med. Sci. 2007. Vol. 26, № 4. P. 72-82.
161. 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.
162. 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.
163. Warkentin T.E., Greinacher A., Koster A. Bivalirudin // Thromb Haemost. 2008. Vol. 99, № 5. P. 830-839.
164. Werner M.H., Wemmer D.E. Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution // Journal BIOCHEMISTRY. 1992. Vol. 31. P. 999-1010.
165. 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.
166. 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.
167. Xiao C.W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans // *J. Nutr.* 2008. Vol. 138, № 6. P. 1244S-1249S.
168. 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.
169. Zavasnik-Bergant T. Cystatin protease inhibitors and immune functions // *Front. Biosci.* 2008. Vol. 1, № 13. P. 4625-4637.
170. 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.
171. 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.
172. 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.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Расшифровка обозначений аминокислот, используемых в формате биологического текста FASTA.

A	Аланин
B	Аспарагиновая кислота или аспарагин
C	Цистеин
D	Аспарагиновая кислота
E	Глутаминовая кислота
F	Фенилаланин
G	Глицин
H	Гистидин
I	Изолейцин
K	Лизин
L	Лейцин
M	Метионин
N	Аспарагин
O	Пиролизин
P	Пролин
Q	Глутамин
R	Аргинин
S	Серин
T	Треонин
U	Селеноцистеин
V	Валин
W	Триптофан
Y	Тирозин
Z	Глутаминовая кислота или Глутамин
X	любая аминокислота
-	пробел неопределенной длины

Расшифровка сокращенных обозначений аминокислот.

Глицин	Gly
Аланин	Ala
Валин	Val
Изолейцин	Ile
Лейцин	Leu
Пролин	Pro
Серин	Ser
Треонин	Thr
Цистеин	Cys
Метионин	Met
Аспарагиновая кислота	Asp
Аспарагин	Asn
Глутаминовая кислота	Glu
Глутамин	Gln
Лизин	Lys
Аргинин	Arg
Гистидин	His
Фенилаланин	Phe
Тирозин	Tyr
Триптофан	Trp