

Uticaj tripsin inhibitora iz soje na zgrušavanje krvi

Ispitivan je uticaj tripsin inhibitora iz soje (SBTI) na koagulaciju krvi. Ekstrakt SBTI je izolovan iz sirovog brašna soje i proveren je njegov uticaj na formiranje aktivnog tromboplastina krvi, trombina i fibrina. Ispitan je i uticaj na vreme koagulacije. Rezultati su pokazali da ekstrakt SBTI ne utiče na formiranje aktivnog tromboplastina i fibrina, ali utiče na formiranje trombina. Dokazano je da ekstrakt SBTI produžava vreme koagulacije.

Uvod

Soja (*Glycine max*) je jednogodišnja mahunarka. Njena zrna sadrže (u suvoj materiji) 36–40% proteina, 15–23% ulja, 34% ugljenih hidrata, 3–6% mineralnih materija i znatan broj vitamina. Među proteinima soje nalazi se i nekoliko tripsin inhibitora. Za ovaj rad je od značaja tripsin inhibitor (SBTI) iz familije Kunitz. Molekulske mase 21500 ± 800 Da (Wu i Scheraga 1972), ovaj protein sadrži 172 aminokiseline i dva disulfidna mosta.

Optimum dejstva SBTI je na pH 7.0, a izoelektrična tačka je pI 4.5 (Kunitz 1947). SBTI gradi kompleks sa trombinom i time utiče na faktor V u kaskadi koagulacije usporavajući dalje pretvaranje protrombina u trombin (Lanchantin 1969). Tagnon i Soulier 1948. godine u eksperimentima *in vivo* na psima i zečevima su utvrdili da davanje injekcije SBTI produžava vreme koagulacije.

Cilj ovog rada je da se proveru kako ekstrakt SBTI utiče na koagulaciju krvi, kao i da se odredi zavisnost vremena koagulacije od primenjene koncentracije SBTI.

Materijal i metode

U prvom delu rada izolovan je SBTI i potom je proveren njegov uticaj na koagulaciju krvi. Nakon što je utvrđen uticaj na koagulaciju ispitan je efekat na svaku fazu koagulacije posebno.

Eksperimenti su rađeni *in vitro*.

Prva faza. Izolovan je ekstrakt SBTI iz sirovog brašna soje. Za tu svrhu razvijen je sledeći postupak.

POSTUPAK: 50 g brašna rastvoreno je u 150 mL 60% izopropanola. Suspenzija je stavljena u ledeno kupatilo i na magnetnu mešalicu. Posle 2 sata mešanja centrifugirana je 15 min na 3000 obrtaja/min. Izdvojen je supernatant i dodatkom 0.1M HCl pH rastvora je podešen na 4.2. Dobijena suspenzija je centrifugirana 15 min na 3500 obrtaja/min. Odbačen je supernatant, a talog koji predstavlja sirovi ekstrakt SBTI rastvoren je u Tris puferu pH 8.5. Za određivanje koncentracije proteina korišćena je metoda po Lowry-u (kao standard je korišćen BSA).

Druga faza. Ispitivano je vreme koagulacije krvi (po metodi Lee-White) u zavisnosti od koncentracije proteina. Pod vremenom koagulacije podrazumeva se vreme koje protekne od momenta uzimanja krvi iz vene do stvaranja koaguluma u epruveti (5-10 minuta na 37°C).

POSTUPAK: U epruvetu je odmereno 1 mL plazme. Odmah po dodavanju CaCl_2 , koji je služio za poništavanje efekta Na-citrata, uključena je štoperica. Kontrola koagulacije vršena je svakih 30-ak sekundi blagim naginjanjem epruvete sve do stvaranja koaguluma.

Treća faza. Ispitivan je uticaj SBTI na svaku od faza koagulacije pojedinačno.

1) Ispitivanje uticaja proteina na predfazu – formiranje aktivnog tromboplastina krvi.

POSTUPAK: Epruvete su stavljene u vodeno kupatilo i zagrejane na 37°C. Zatim je dodato 0.5 mL plazme (razblažene puferom u odnosu 1:10) i 0.5

Dušan Vlajin (1991), Niš, Homoljska 1, učenik 1. razreda Gimnazije "Bora Stanković" u Nišu

mL rastvora CaCl₂. Posle dodavanja CaCl₂, uključena je štoperica, i na po jedan minut (u toku 6 minuta) je uziman alikvot od 0.1 mL i prenošen u epruvetu koja se već nalazila u vodenom kupatilu i u kojoj je bio 0.1 mL CaCl₂. Posle svake probe zabeleženo je vreme koagulacije (7-11 sekundi) (Kulić-Japundžić i Rakić 1983).

2) Ispitivanje uticaja SBTI na prvu fazu koagulacije – formiranje trombina

POSTUPAK: U epruvetu je sipano 0.1 mL suspenzije tromboplastina i 0.1 mL CaCl₂ (zagrejan koji minut na 37°C u vodenom kupatilu). Posle 10 sekundi dodat je 0.1 mL ispitivane plazme. Odmah posle dodavanja plazme uključena je štoperica i zabeleženo je vreme koagulacije. Plazma normalno koaguliše pri ovim uslovima za 11-13 sekundi (Kulić-Japundžić i Rakić 1983).

3) Ispitivanje uticaja SBTI na drugu fazu koagulacije – formiranje fibrina

POSTUPAK: U epruvetu je sipano 0.1 mL ispitivane plazme i 0.1 mL fiziološkog rastvora. Sadržaj epruvete je promešan i stavljen u vodeno kupatilo na 37°C. Posle 10 sekundi dodat je 0.1 mL rastvora trombina i zabeleženo je vreme koagulacije plazme.

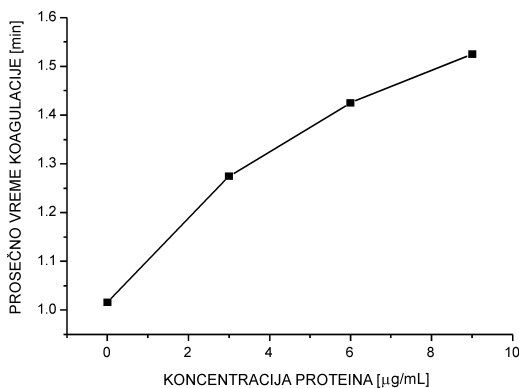
Rezultati i diskusija

Dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

Koncentracija proteina u sirovom ekstraktu SBTI iznosila je oko 60 µg/mL.

Prosečno vreme koagulacije plazme bez ekstrakta SBTI je 61 sekunda, dok se pri dodatku SBTI do koncentracije 3 µg/mL vreme koagulacije povećava na 87.5 sekundi (povećanje od 43.4%). Pri koncentraciji 6 µg/mL SBTI vreme koagulacije iznosi 102.5 sekundi što znači da se u odnosu na vreme koagulacije bez ekstrakta SBTI povećalo za 41.5 sekundi (68%). Pri koncentraciji 9 µg/mL vreme iznosi 112.5 sekundi što predstavlja produženje vremena potrebnog za koagulaciju za 51.5 sekundi (84.4%) (tabela 1). Može se uočiti da povećanje koncentracije SBTI dovodi do produžetka vremena koagulacije.

Povećanje vremena koagulacije prikazano je i na grafiku zavisnosti vremena koagulacije od koncentracije ekstrakta SBTI (slika 1). Oblik krive ukazuje na inhibiciju nekog od elemenata kaskade koagulacije po kinetici zasićenja.



Slika 1. Zavisnost vremena koagulacije od koncentracije ekstrakta SBTI

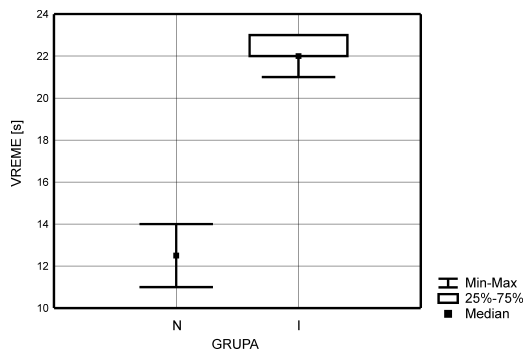
Figure 1. Coagulation time depending on SBTI extract concentration

Tabela 1. Uticaj ekstrakta SBTI-a na vreme koagulacije krvi (u sekundama)

Koncentracija SBTI µg/mL	Redni broj probe			
	I	II	III	IV
0	60	60	60	65
3	90	85	90	85
6	100	100	105	105
9	110	115	110	115

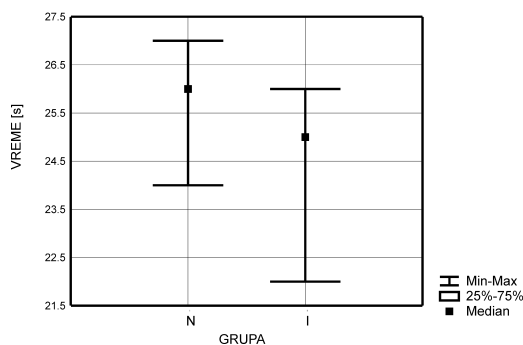
Tabela 2. Uticaj ekstrakta SBTI-a na stvaranje aktivnog tromboplastina krvi (u sekundama)

Vrsta probe	Redni broj epruvete					
	I	II	III	IV	V	VI
Prva nula	11	10	9	10	9	12
Druga nula	10	9	8	9	8	6
Treća nula	11	10	9	8	7	7
Prva proba	/	10	10	9	9	8
Druga proba	12	11	9	10	9	8
Treća proba	11	10	10	8	9	7



Slika 2. Uticaj ekstrakta SBTI na vreme potrebno za stvaranje trombina. N – bez tretmana SBTI, I – sa tretmanom SBTI

Figure 2. Influence of STBI extract on thrombin formation time. N – without SBTI treatment, I – with SBTI treatment



Slika 3. Uticaj SBTI na vreme stvaranje fibrina. N – bez tretmana SBTI, I – sa tretmanom SBTI

Figure 3. Influence of STBI extract on fibrin formation time. N – without SBTI treatment, I – with SBTI treatment

Pod "nulom" se podrazumeva proba bez SBTI-a, dok se pod probom misli na ispitivano vreme koagulacije sa SBTI-om

Vreme potrebno za stvaranje aktivnog tromboplastina krvi bez ekstrakta SBTI je za prvu epruvetu prosečno 10.7, drugu 9.7, treću 8.7, četvrtu 9, petu 8 i šestu 8.3 sekundi. Prosečna vrednost vremena za prvu epruvetu sa ekstraktom se povećala za 0.5 sekundi (4.7 %), za drugu 1 (10.3 %), treću 1 (11.5 %), četvrtu 0 (0 %) i petu 1 sekundu (12.5 %). Prosečno vreme za šestu epruvetu se smanjilo za 0.6 sekundi (7.2 %) (tabela 2).

Eksperimentalno je utvrđeno da ekstrakt SBTI produžava vreme potrebno za stvaranje trombina jer se prosečno vreme pri dodatku ekstrakta do koncentracije od 6 $\mu\text{g/mL}$ povećava sa 12.5 sekundi na 22.2 sekundi što predstavlja povećanje od 56.6% (slika 2).

Prosečno vreme potrebno za stvaranje fibrina se sa 25.7 sekundi smanjilo na 24.3 sekunde (5.4%) (slika 3).

Uočeno je da svinjska plazma brže koagulira od ljudske što može da objasni zašto su dobijena vremena koagulacije nešto kraća od uobičajenih vrednosti za ljudsku plazmu.

Pretpostavljen je sledeći mehanizam delovanja SBTI: u početnoj fazi koagulacije manje količine stvorenog trombina utiču da se uz učestće faktora V ubrza pretvaranje protrombina u trombin. SBTI gradi kompleks sa trombinom i time ga sprečava da utiče na faktor V što usporava dalje pretvaranje protrombina u trombin i produžava vreme koagulacije (Lanchantin *et al.* 1969).

Zaključak

Rezultati istraživanja pokazuju da ekstrakt SBTI deluje antikoagulatивно produžavajući vreme koagulacije, najverovatnije gradeći kompleks sa trombinom, čime dolazi do usporavanja aktivacije faktora V. Zbog nedostatka ovog faktora se usporava pretvaranje protrombina u trombin i cela kaskada se odvija usporeno.

Dalja istraživanja iz ove oblasti treba usmeriti na ispitivanje osobina ovog i ostalih tripsin inhibitora koji se nalaze u različitim biljnim proizvodima, a koriste se u ishrani ljudi i životinja. To će možda dovesti do njihove praktične primene i razvoja novih medikamenata za kontrolu procesa koagulacije krvi.

Zahvalnost. Dr Pedragu Đorđeviću, transfuziologu – za pomoć pri nabavci potrebnih rastvora za izvođenje eksperimenata. Mlađim saradnicima i rukovodiocu seminara – na pruženoj podršci i pomoći.

Literatura

Lanchantin G., Friedmann J., Hart D.W. 1969. Interaction of soybean trypsin inhibitor with thrombin and its effect on prothrombin activation. *Journal of Biological Chemistry*, **244**: 865

Kulić-Japundžić I., Rakić Lj. 1983: *Biohemija – praktična nastava i teorijski pregled*. Beograd: IRO Svetozar Marković

Kunitz M. 1945. *Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean*. *Science*, **101**: 668.

Tagnon H. J. and Soulier J. P. 1948. The effect of intravenous injection of trypsin inhibitor on the coagulation of blood. *Blood*, **3**: 1161.

Wu Y. V., Scheraga H. A. 1972. Studies of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*, **1**: 698.

Dušan Vlajin

Influence of Trypsin Inhibitors in Soya on Blood Coagulation

The influence of soy bean trypsin inhibitor (SBTI) on blood coagulation was investigated. SBTI was isolated from soy flour, using a new protocol. We investigated the overall effect on coagulation time, as well as the effect on active thromboplastin, thrombin and fibrin formation. The analyses were performed using the Lee-White method.

The results show that SBTI has an influence on coagulation time, and that coagulation time is dependent of the used SBTI concentration. Average coagulation time without SBTI is 61 s, while at concentrations of 3, 6 and 9 $\mu\text{g/mL}$ average coagulation time increases to 87.5, 102.5 and 112.5 s, respectively. The increase is statistically significant ($p = 0.05$) for all concentrations. The results are shown in Figure 1. It can be observed that the reaction of SBTI occurs with saturation kinetics.

SBTI did not affect the formation of active thromboplastin and fibrin, but it did show a statistically significant increase in thrombin formation time. At a concentration of 6 $\mu\text{g/mL}$ average thrombin formation time increased from 12.5 to 22.2 s.

We proposed a mechanism to account for the effect of SBTI. Thrombin reacts with SBTI, thereby forming a complex which interferes with the creation of cofactor V. This in turn slows down the conversion of prothrombin to thrombin, and the whole coagulation cascade. Due to great importance of blood coagulation in modern medicine and the widespread use of plants that contain coagulation inhibitors, further studies in this field are needed. 