

# Лекция 8.

## Система гемостаза и ее нарушения

Для дополнительной информации смотри  
файл Гемостаз.doc

# Гемостаз

- Остановка кровотечения (гемостаз, Hemostasis) при повреждении сосуда происходит прежде всего за счет **сокращения** (спазма) **сосуда**, которое возникает:
  - 1) вследствие **рефлекторной стимуляции** гладких мышц сосуда со стороны **симпатической нервной системы** и
  - 2) действия сосудосуживающих веществ, в частности, **серотонина**, секретируемого тромбоцитами, и **тромбоксана A<sub>2</sub>**, синтезируемого активированными тромбоцитами.
- Спазм сосуда ограничивает первоначальную потерю крови из раны и благоприятствует местному накоплению гемостатических веществ.
- Одновременно начинается взаимодействие крови со структурами поврежденного сосуда, что приводит сначала к образованию **тромбоцитного агрегата** в зоне дефекта сосуда, а затем к образованию **сгустка крови** на основе тромбоцитного агрегата.

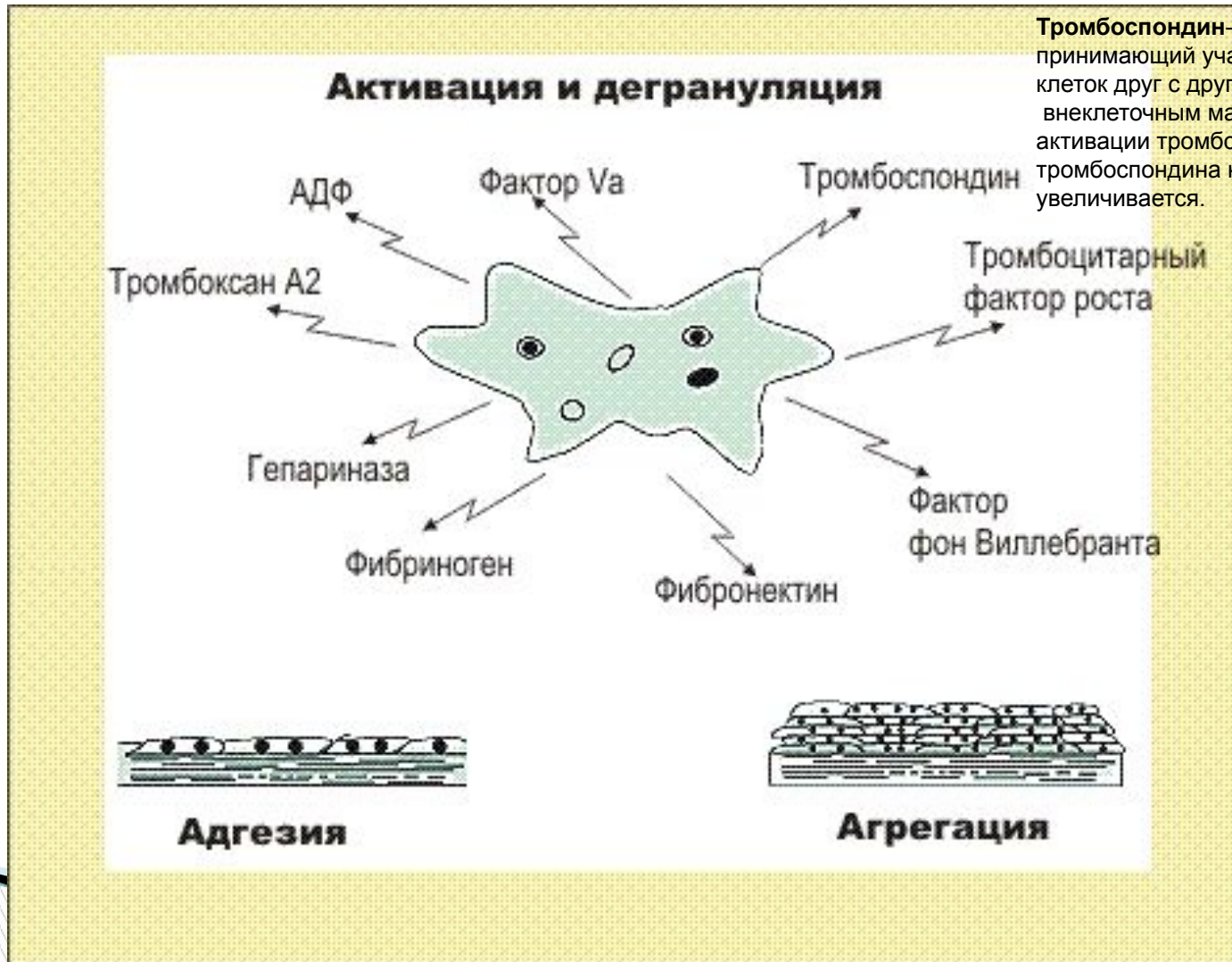
# Система гемостаза

- Система гемостаза – защитная система организма, обеспечивающая сохранение крови в жидком состоянии в пределах кровеносных сосудов и образования тромбов в области повреждения стенки сосудов. Включает следующие стадии:
- Локальная вазоконстрикция (сокращение сосудов в области повреждения)
- Образование тромбоцитарного тромба
- Стабилизация тромба фибрином
- Ретракция (сокращение) тромба
- Растворение тромба после восстановления повреждения стенки сосуда

# Адгезия, активация и агрегация тромбоцитов

- Первый этап в процессе свертывания крови - **адгезия тромбоцитов** (прилипание тромбоцитов к месту повреждения, например, к субэндотелиальному слою, в частности, к **коллагену**).
- После этого происходит **активация и дегрануляция** тромбоцитов с секрецией АДФ, серотонина, адреналина. **Адреналин, коллаген и тромбин**, связываясь с мембранными рецепторами, активируют два фермента - **фосфолипазу C и фосфолипазу A<sub>2</sub>**, что приводит к секреции простагландинов и тромбоксана A<sub>2</sub>. Образовавшийся инозитол, 1,4,5-трисфосфат приводит к выходу ионов Ca и повышению внутриклеточной концентрации в тромбоцитах. Ca<sup>2+</sup> запускает фосфорилирование легких цепей миозина, облегчая его взаимодействие с актином, что обеспечивает перемещение гранул и изменение формы тромбоцитов.
- Рецепторы коллагена на тромбоцитах (интегрин α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> и гликопротеин VI) обеспечивают активацию каскада коагуляции, которые ведут к высвобождению факторов свертывания.
- При активации тромбоцитов его **дисковидной формы тромбоцитов** **меняется на сферическую**, у тромбоцита образуются отростки (псевдоподии тромбоцитов).
- На последнем этапе происходит **агрегация** тромбоцитов (связывание активированных тромбоцитов с тромбоцитами, прилипшими к месту повреждения).

# Активация тромбоцитов и секреция тромбоцитарных факторов



**Тромбоспондин**- гликопротеин, принимающий участие в адгезии клеток друг с другом и клеток с внеклеточным матриксом. После активации тромбоцитов количество тромбоспондина на мембране резко увеличивается.

# Факторы системы свертывания крови

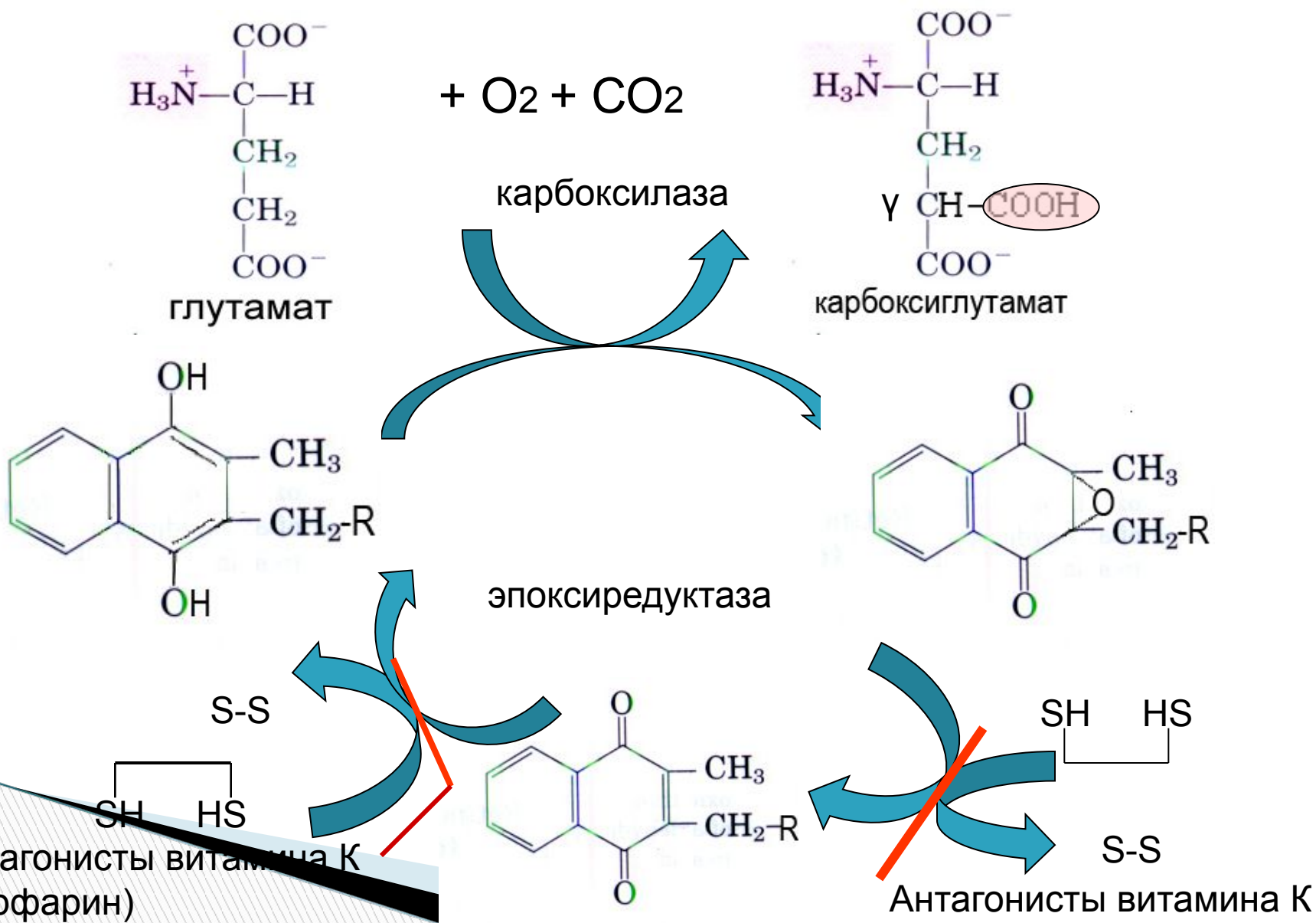
- В системе свертывания крови имеются **плазменные и тромбоцитарные** факторы. Международный комитет по гемостазу и тромбозу присвоил арабскую нумерацию тромбоцитарным и римскую — плазменным факторам. Всего выделяют 13 плазменных факторов и 22 тромбоцитарных.
- В активированной форме 6 плазменных факторов крови и калликреин\* (протеаза, обеспечивающая образование естественных полипептидов, которые являются активными вазодилататорами, снижают кровяное давление и вызывают расслабление гладкой мускулатуры) – это сериновые протеазы.
- Механизм свертывания крови представляет собой **каскад реакций ограниченного протеолиза белковых факторов**, что в конечном итоге приводит к полимеризации последнего продукта - **фибрина**.
- **Протеазные домены** располагаются в **С-концевых частях молекул факторов свертывания крови**, аминокислотные последовательности в этих областях гомологичны таковым трипсина и химотрипсина (механизм действия химотрипсина дан в приложении в конце лекции).
- **Селективность** действия протеаз в системе гемостаза обеспечивается структурой N-концевых частей молекул.
- \* В норме кинин-калликреиновая система и ренин-ангиотензин-альдостероновая система регулирует локальную микроциркуляцию. Если преобладает активность ренин- ангиотензиновой системы, артериолы сокращаются и повышается кровяное давление. Усиление активности калликреин-кининовой системы ведёт к местному расширению сосудов и покраснению кожи, что, например, наблюдается при воспалении (эритема).

# Структура N-концевых частей молекул факторов плазмы крови

- В **N-концевой части** протромбина (II), факторов свертывания крови VII, IX, X, а также протеинов C и S содержится до 12 остатков **γ-карбоксиглютаминовой кислоты**, образующейся вследствие посттрансляционного γ-карбоксилирования остатков Glu под действием карбоксилазы и витамин K-эпоксидредуктазы.
- Остатки карбокси-Glu связывают ионы Ca, что стабилизирует структуру белков, необходимую для их взаимодействия с фосфолипидами.
- При дефиците витамина K или наличии его антагонистов, синтезируются факторы, обладающие низкой активностью (PIVKA-белки, индуцируемые антагонистами витамина K)

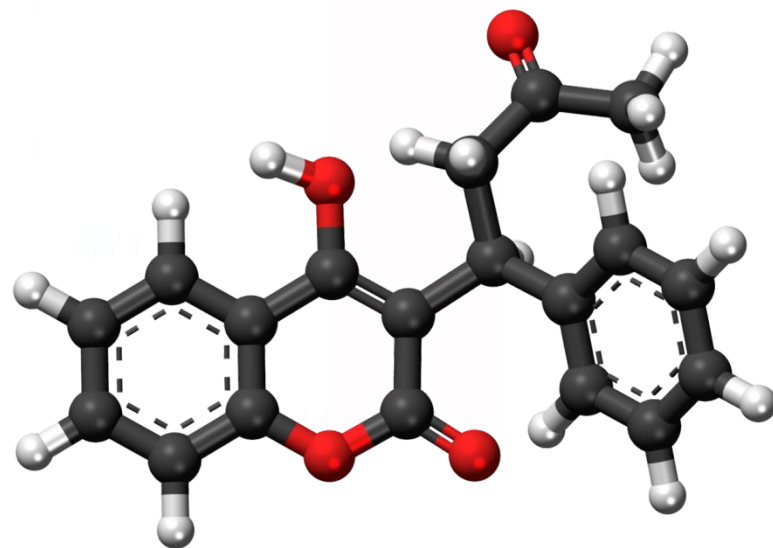
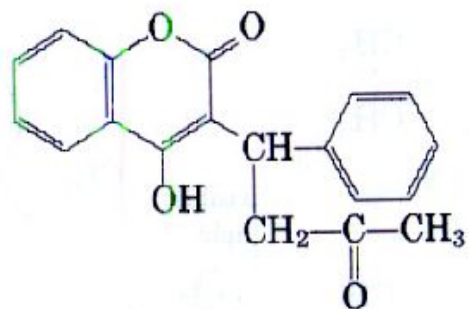
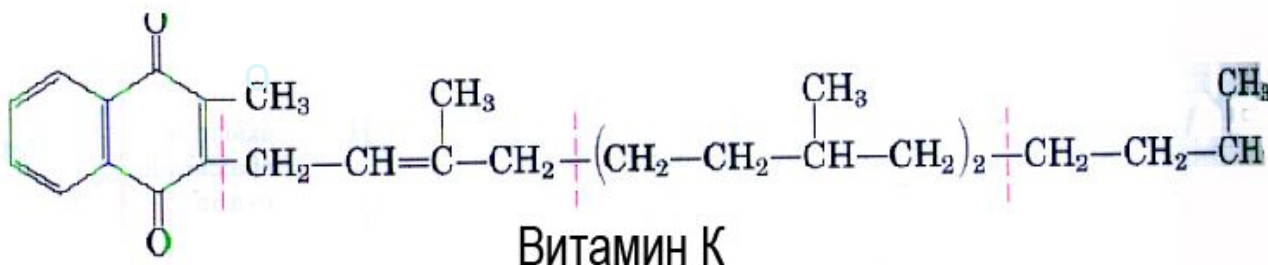


# Карбоксилирование глутамата





# Витамин К и его антагонист варфарин

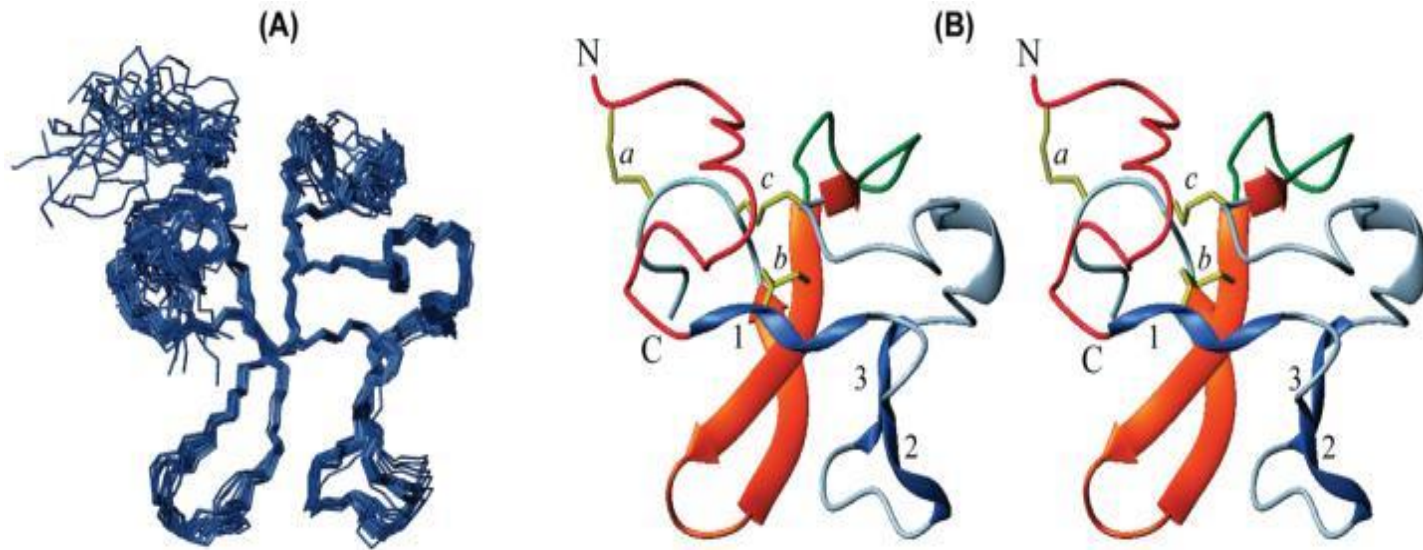


Варфарин применяется в медицине для терапии тромбозов

# Домены, присутствующие в факторах системы свертывания

- ▣ **Крингл-домен.** Протромбин (фактор XII ) и ферменты системы фибринолиза содержат участки с 80 аминокислотами, имеющими форму петли в виде сплюснутого бублика (крингл-домен). Обеспечивает **взаимодействие с другими факторами гемостаза.**
- ▣ **Ароматические аминокислоты.** Протромбин, факторы VII, IX и X содержат последовательность **Phe-Trp-X-X-Tyr**, в которой ароматические боковые цепи экспонированы наружу, создавая гидрофобный участок, взаимодействующий с **мембранами клеток.**
- ▣ **Домены фибронектина.** Фактор XII содержит два участка, гомологичных фрагментам фибронектина типа I и II. Фрагмент типа II принимает участие во взаимодействии с **коллагеном.**

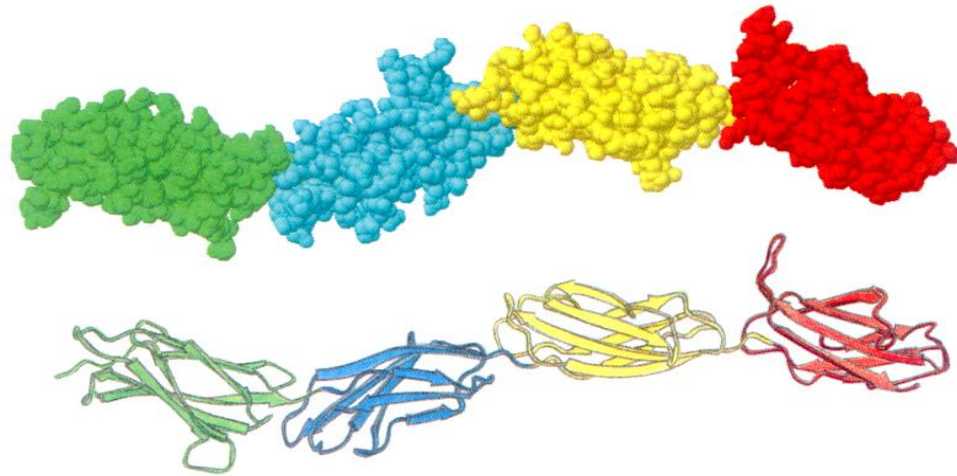
# Структура крингл-домена



Крингл-домены в единственном числе обнаружены в урокиназе (протеолитический фермент, активатор плазминогена), факторе XII, по два выявлено в протромбине и тканевом активаторе плазминогена, по 4 - в белке-факторе роста гепатоцитов и 5 - в плазминогене.

# Домены фибронектина

Фибронектин - гликопротеин, присутствующий в виде фибриллярной сети на поверхности клеток и в виде растворимой формы в крови. Фибронектин связывается с агрегирующими коллагеновыми фибриллами, изменяя кинетику их агрегации. Все домены фибронектина сильно гликозилированы: присоединенные олигосахаридные цепи делают белок «клейким».



В фибронектине идентифицированы **домены**, отвечающие за способность белка связываться с коллагеном, фибрином, фактором XIII свертывания крови.

# EGF (epidermal growth factor)-

## ДОМЕНЫ

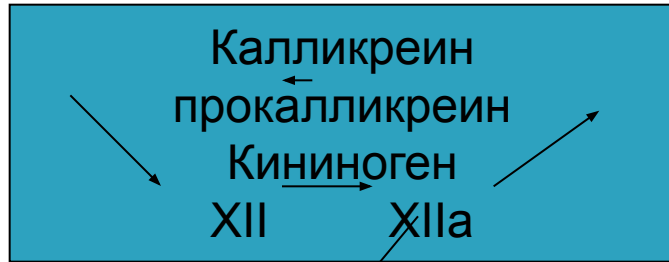
- ▣ **EGF-домены.** Факторы VII, IX, X и XII содержат последовательность из 50 аминокислот, гомологичную таковой для белков семейства фактора роста эпидермиса (EGRF). В ней присутствует одна или несколько характерных аминокислотных последовательностей:  
**CX<sub>7</sub>CX<sub>4-5</sub>CX<sub>10-13</sub>CXCX<sub>8</sub>GXRC,**
- ▣ где **X** — любая аминокислота. Входящие в нее шесть цистеиновых остатков формируют три внутримолекулярные дисульфидные связи, что создает три структурных цикла, имеющих особое значение, так как они участвуют в связывании членов семейства ЭФР с рецепторами клеточной поверхности. Эти домены обеспечивают связывание факторов с **рецепторами поверхности клеток или рецепторными доменами двух факторов V и VIII.**

# Факторы системы свертывания крови

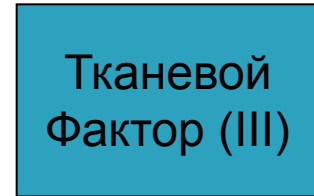
Название	Мол. Масса (кДа)	время полужизни	Функция
Фибриноген (I)	340	3 дн.	структурная
Протромбин (II)	72	4-5 дн.	профермент
Тканевой ф-р (III)	37		активатор
Ионы Са (IV)			кофактор
Проакцелерин (V)	330	1 дн	кофактор
Проконвертин (VII)	50	5 ч	профермент
Фактор VIII (антиге- мофильный A)	330	10 ч	кофактор
Фактор IX (антиге- мофильный B)	56	20 ч	профермент
Фактор X	56	3 дн.	профермент
Фактор XI	160	3 дн.	профермент
Фактор XII	80	3 дн.	профермент
Фактор XIII (тромбо- цитарный)	150	12 дн	профермент
Прекалликреин (плазменный)	80		ф-р контактной активации
<b>ВМК</b>	110		ф-р контактной активации

# Схема основных реакций активации свертывания крови

## Внутренний путь



## Внешний путь



Антигемофильный В

XI → XIa

Антигемофильный А

VII +

VIIa

IX

IXa + VIII + Ca + X

Мембраны клеток тромбоцитов

Мембраны клеток тромбоцитов

Мембраны клеток тромбоцитов

Мембраны клеток тромбоцитов

V + Ca + Xa + протромбин

Тромбин

Фибриноген → Фибрин мономер

Фибрин

Стабилизированный фибрин

XIIIa ← XIII

Появляется при повреждении ткани



# Кинин-калликреиновая система

- Каллекреин – сериновая протеаза, катализирующие образование кининов из кининогенов
- Кинины - группа биологически активных олигопептидов, к которой относятся (у млекопитающих) брадикинин, лизилбрадикинин (каллидин), метиониллизилбрадикинин и изолейцилсерилбрадикинин (Т-кинин). Образуются в плазме крови и межклеточных пространствах при протеолизе неактивных белков-предшественников – кининогенов.

# Фактор XIII

- Две формы: **плазменная и тромбоцитарная**. Плазменная: тетрамер из двух пар цепей ( $\alpha$  и  $\beta$ ), тромбоцитарный содержит только  $\alpha$ -цепь.
- Активация фактора XIII (плазменная форма) происходит в 2 этапа: сначала под действием **тромбина или  $X_a$**  происходит расщепление  $\alpha$ -цепи с освобождением **пептида активации**, а затем тетрамер распадается с образованием активного димера состоящего из **2  $\alpha$ -цепей**.
- Активированный фактор XIII катализирует образование  **$\epsilon$ -( $\gamma$ -глутамил)-лизиновых связей между полипептидами в комплексах белков**. Под действием фактора XIII происходит «сшивание» мономеров фибрина в полимер, а также «пришивание»  $\alpha_2$ -антиплазмина, коллагена и фибронектина, необходимое для образования тромба.

# Белки – активаторы протеаз системы свертывания крови

- Факторы V и VIII (антигемофилийный фактор А) выполняют сходные функции. Они обеспечивают связывание витамин К-зависимых активированных факторов IX и X с фосфолипидами. Наличие таких взаимодействий увеличивает эффективность реакций активации в 100 000 раз.
- Факторы V и VIII синтезируются как полипептиды. Оба белка содержат по 2 домена, гомологичных церулоплазмину, по 2 гомологичных С-домена и большой В-домен, который отщепляется при активации факторов. Фактор VIII подвергается протеолизу в С-концевой части В-домена, в крови присутствует в виде набора гетеродимеров, взаимодействующих с ионами Ca.

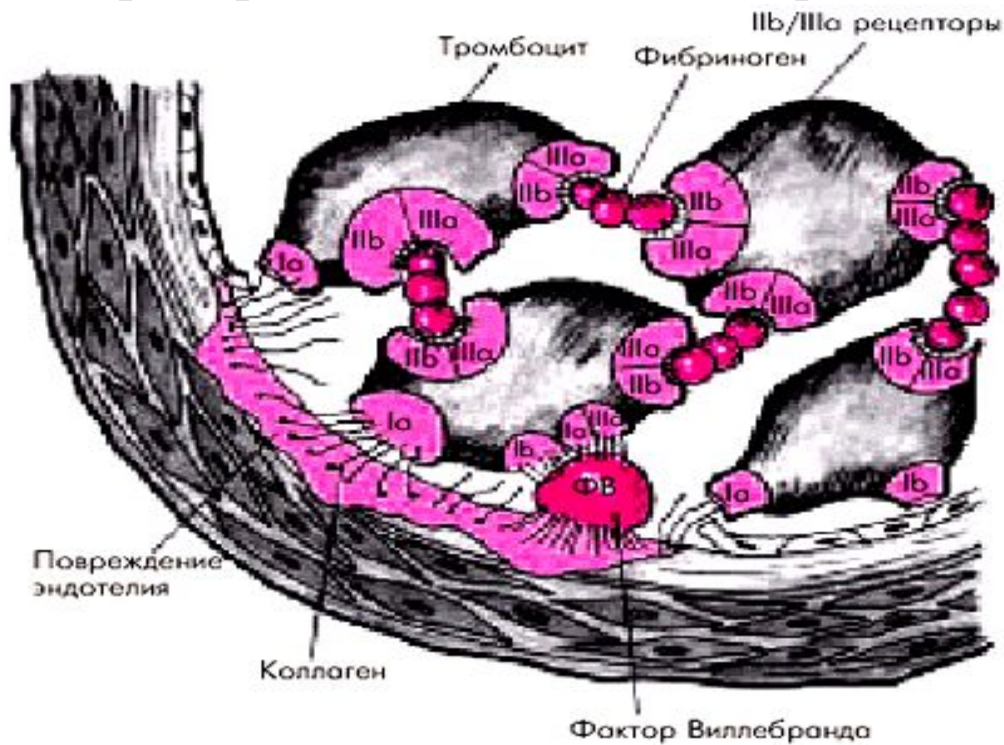
# Белки – активаторы протеаз системы свертывания крови

- В свою очередь **факторы V и VIII** активируются под действием тромбина или фактора Ха. Тромбин расщепляет фактор V по остаткам аргинина 709, 1018, 1545, а фактор VIII – по остаткам Arg 372, 740 и 1689. В активированной форме фактор V – гетеродимер (A1-A2/A3-C1-C2), а фактор VIII – гетеротример (A1/A2/A3-C1-C2), субъединицы которых взаимодействуют при участии ионов Ca. **C-концевые участки этих факторов взаимодействуют с фосфолипидами.**

# Фактор фон Виллебранда

- В плазме крови **фактор VIII** циркулирует в виде комплекса с фактором фон Виллебранда (vWF) – **адгезивным белком, обеспечивающим связывание тромбоцитов с субэндотелиальными структурами и склеивание тромбоцитов при агрегации.** Кроме того, vWF повышает стабильность фактора VII и его защиту от инактивации протеином С.
- Синтезируется как полипептид из 2050 аминокислот, а затем полимеризуется с образованием комплексов с молекулярной массой до 2 000 000. Димеры vWF постоянно секретируются в плазму, а **мультимеры присутствуют в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов и секретируются из них при активации.** Мультимеры vWF играют ведущую роль в адгезии тромбоцитов и образовании тромбоцитарных агрегатов **в условиях высокого напряжения сдвига**, которое характерно для узких сосудов и стенозированных участков артерий.

# Фактор фон Виллебранда



Недостаточность этого фактора приводит к увеличению риска кровоизлияния (болезнь фон Виллебранда), а в сочетании с гипертонией увеличивает риск мозгового кровоизлияния. **Болезнь фон Виллебранда** врождённое отсутствие мультимерных форм фактора фон Виллебранда, необходимых для агрегации тромбоцитов. Проявляется как **геморрагический синдром**, характеризующийся тенденцией к кровотечению из слизистых оболочек, увеличением времени кровотечения.

# Внешний путь: тканевой фактор

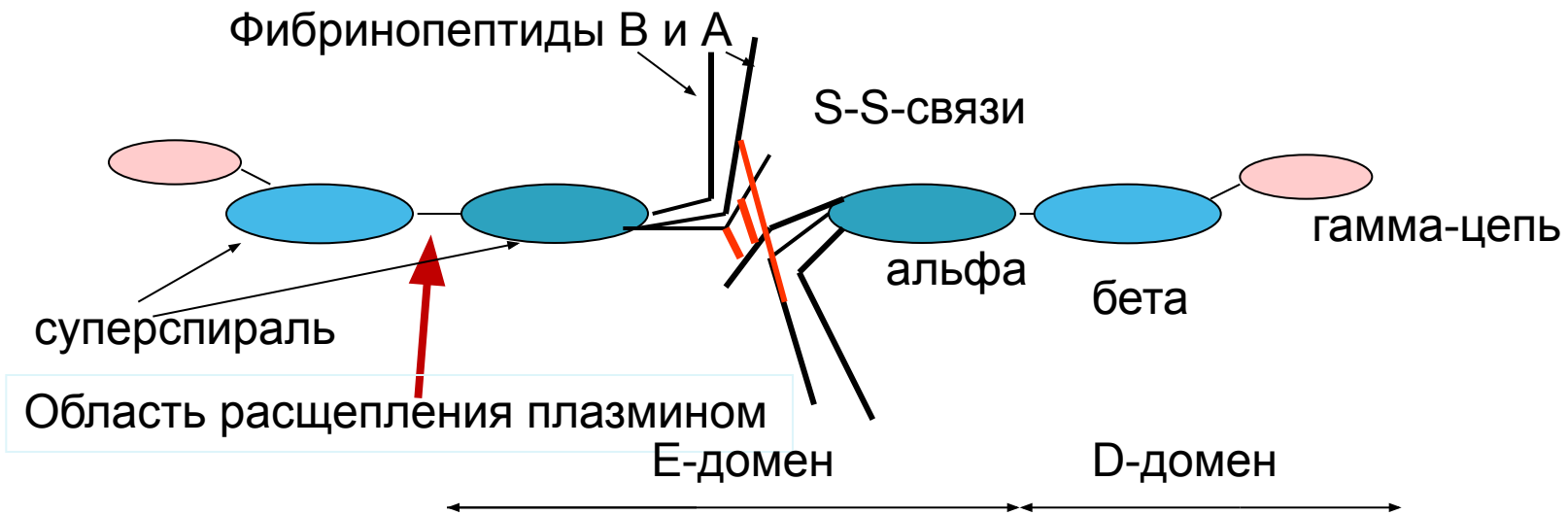
## (III)

- Тканевой фактор III - трансмембранный гликопротеид, выполняющий функции **рецептора фактора VII** и модулирующий его активность. Активность фактора III зависит как от самого белка, так и от фосфолипидов мембраны клеток. Связывание **одноцепочечной формы фактора VII (проконвертин) с фактором III** изменяет структуру фактора VII так, что становится возможным его расщепление до двухцепочечной формы, которая в комплексе с фактором III активирует факторы свертывания крови X и XI, что инициирует каскад коагуляции.
- Высокое содержание фактора III характерно для **мозга, миокарда, клеток эпидермиса и эпителия, выстилающего слизистые оболочки**. Клетки эндотелия и моноциты могут экспрессировать фактор III под действием **цитокинов, эндотоксина, окисленных ЛНП и иммунных комплексов**, обеспечивая образование внутрисосудистых тромбов при ряде заболеваний.
- Фактор III состоит из 263 аминокислот, он отдаленный родственник суперсемейства белков, включающего рецепторы гормона роста, ИЛ-1-7. Связывание фактора VII с фактором III стимулирует миграцию ГМК, рост и метастазирование опухолей. Избирательное повреждение гена фактора III приводит к аномалиям в развитии сосудов.



# Фибриноген (I)

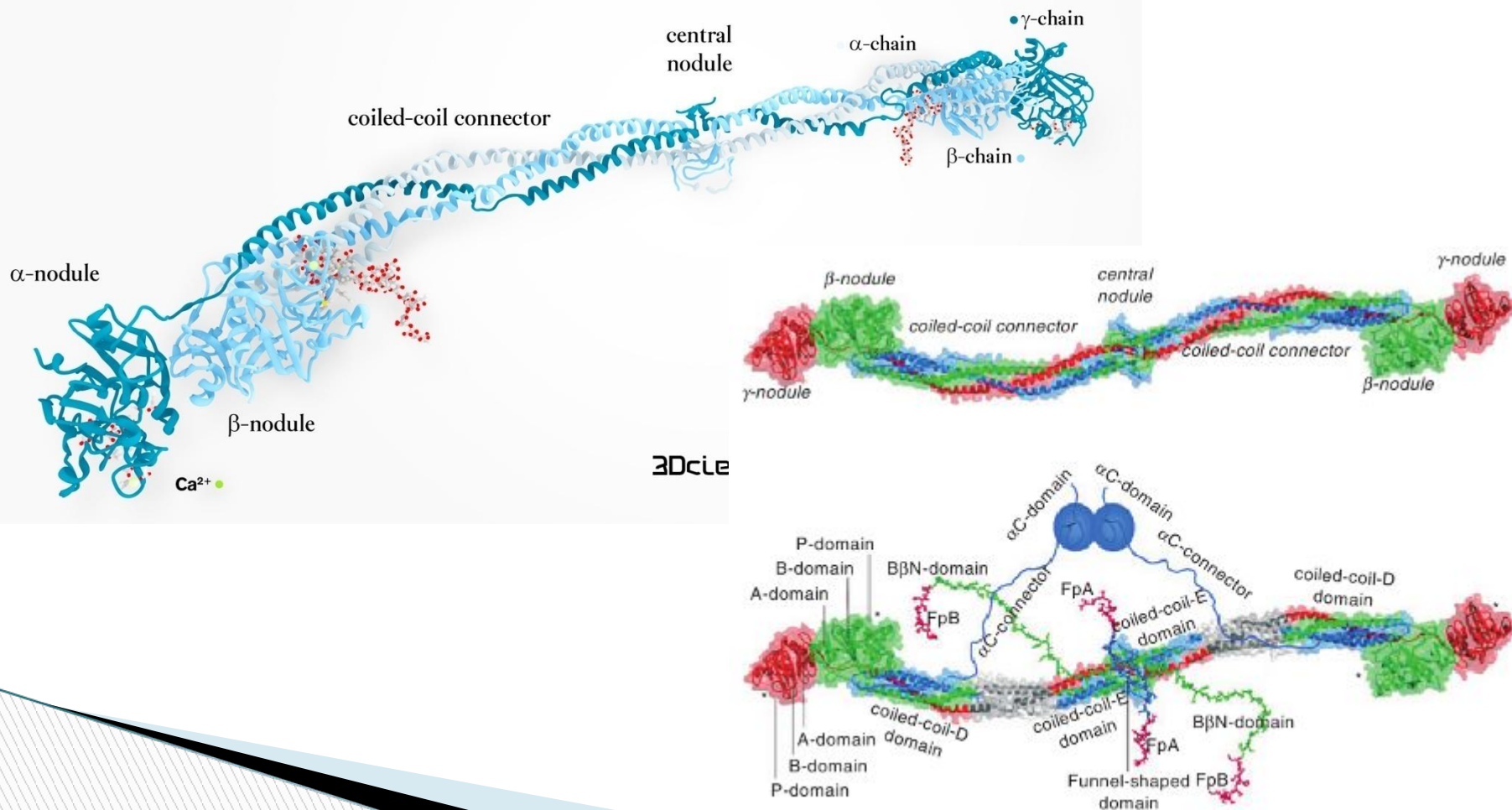
- Фибриноген состоит из трех пар неидентичных полипептидных цепей:  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  и  $\gamma$  (67, 52 и 47 кДа). Молекула фибриногена симметрична, слегка изогнута, размер 7x48 нм. N-концевые части всех трех субъединиц образуют центральную область взаимодействия двух половин молекулы фибриногена (E-домен), которые связаны тремя дисульфидными связями.



Далее следует область, где **три субъединицы закручены в суперспираль**. Примерно посередине имеется неспиральная область специфического расщепления плазмином.

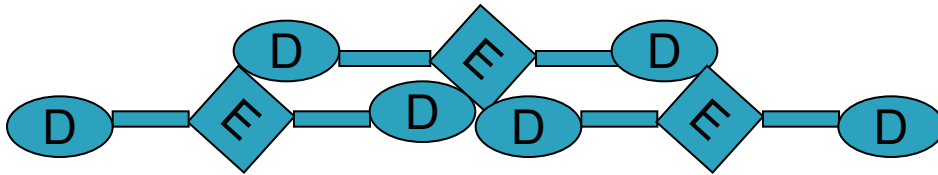
# Структура фибриногена

Human Fibrinogen



# Полимеризация фибрина

- Полимеризация фибрина начинается после отщепления тромбином N-концевого 16 членного **фибринопептида А** в  $\alpha$ -цепи, в результате чего открывается **участок Gly-Pro-Arg, взаимодействующий с участком С-концевой части  $\gamma$ -цепи.**
- Этим инициируется самосборка протофибрилл, в которой D-домен одной молекулы взаимодействует с E-доменом второй



**Отщепление от N-конца В-цепи 14 членного пептида и экспозиция участка Gly-His-Arg ускоряет процесс сборки и латеральную ассоциацию протофибрилл.** Ветвление с образованием трехмерной сетки обусловлено С-концевыми доменами  $\alpha$ -цепи.

Механическая стабильность повышается, когда под действием фактора XIII образуются ковалентные связи между смежными мономерами фибрина в полимере. Сначала **попарно сшиваются  $\gamma$ -**, а затем -  **$\alpha$ -цепи.**

# Фибриноген

- Последовательность каждой из цепей кодируется своим геном, которые возникли в результате дупликации одного гена-предшественника.
- $\gamma$ -цепь существует также в минорной форме (около 10%), у которой в результате альтернативного сплайсинга С-концевой тетрапептид заменен на 20-членный пептид. **Фибриноген с удлинённой цепью менее эффективно взаимодействует с тромбоцитами.**
- Обнаружены полиморфные участки в  $A\alpha$ -цепи (Thr/Ala312) и в  $\beta B$ -цепи (Arg/Lys448). У мужчин, гомозиготных по Arg 448 уровень фибриногена в крови ниже, чем у гетерозигот и гомозигот по Lys448. Кроме того, есть полиморфизм в области промотора В-гена. Т.о. **уровень фибриногена частично определяется генетически.**
- Фибриноген подвергается множественной посттрансляционной модификации: гликозилированию, фосфорилированию, сульфатированию (Tyr 418, 422) минорных  $\gamma$ -цепей и гидроксिलированию Pro31 в  $\beta$ -цепи.
- В  $A\alpha$ -цепях фосфорилируются Ser3 и Ser 345. Степень фосфорилирования второго Ser влияет на структуру фибринового геля: дефосфорилированный белок образует при полимеризации более толстые нити, фосфорилированный белок более устойчив к протеолизу.

# Фибриноген

- Фибриноген связывает три иона  $\text{Ca}$  с Кд около 1 мкМ и около 10 ионов  $\text{Ca}$  с Кд около 1 мМ.
- Участки **высокого сродства гомологичны центрам связывания  $\text{Ca}$  на кальмодулине** (мотив E-F-рука) они находятся в С-концевой области  $\gamma$ -цепи. Мутации в этой области приводят к нарушению полимеризации фибрина. С низким сродством  $\text{Ca}$  связывается с участками сиаловых кислот.
- Молекула фибриногена содержит **2 участка гликозилирования, от которых отходят 4 раздваивающиеся углеводные цепи с сиаловыми кислотами на концах.** Они играют важную роль в полимеризации: **при их отщеплении скорость полимеризации фибрина возрастает**, отщепление всех углеводов устраняет влияние  $\text{Ca}$  на полимеризацию. Увеличение содержания сиаловых кислот, связанное с увеличением активности сиалтрансферазы, приводит к дисфибриногенемии.
- Дисфибриногенемия – нарушение функций фибриногена. Описано более **80 вариантов мутаций**, которые влияют на отщепление фибринопептидов, полимеризацию, взаимодействие с тромбоцитами и эритроцитами, нарушение сшивания и разрушение фибрилл.

# Фибриноген

- Синтез фибриногена значительно повышается при многих заболеваниях, он стимулируется ИЛ-6.
- Уровень фибриногена в крови увеличивается 1) с **возрастом**, 2) **при гиперлипидемии**, 3) **курении** и 4) **приеме пероральных контрацептивов**.
- Максимальная концентрация фибриногена в крови в зимние, минимальная – в летние месяцы.
- Повышение уровня фибриногена рассматривают как **фактор риска возникновения сердечно-сосудистых осложнений**. Фибриноген влияет на вязкость крови, повышает агрегацию тромбоцитов и эритроцитов. Он накапливается в области атеросклеротических бляшек. Фибрин и продукты его расщепления стимулируют пролиферацию ГМК и моноцитов.

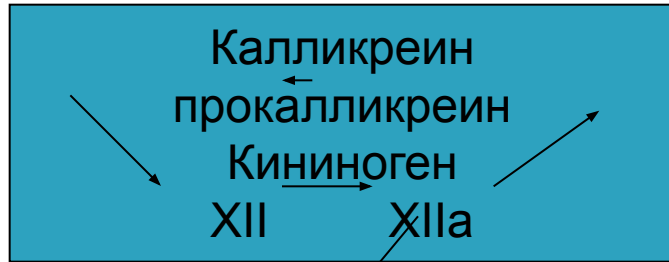
# Активация свертывания крови

- Свертывание крови – результат серии реакций, в которых путем ограниченного протеолиза **образуются активные компоненты системы свертывания**. Многоступенчатость и ферментативная природа реакций активации обеспечивает возможность мощного **«усиления сигнала»** и эффективность контроля, который должен происходить **локально** в области повреждения стенки сосуда
- Существуют два пути активации свертывания крови: **внутренний и внешний**.

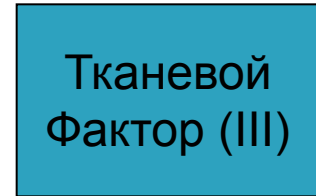


# Схема основных реакций активации свертывания крови

## Внутренний путь



## Внешний путь



**Антигемофильный В**

XI → XIa

**Антигемофильный А**

VIIa

IX → IXa+VIII+Ca+X

Мембраны клеток тромбоцитов

Мембраны клеток тромбоцитов

V+Ca+Xa+протромбин

Тромбин

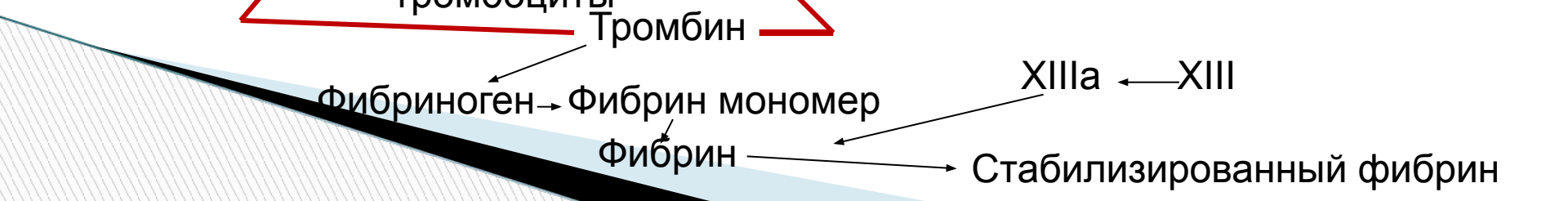
Фибриноген → Фибрин мономер

Фибрин

XIIIa ← XIII

Стабилизированный фибрин

Появляется при повреждении ткани



# Кинин-калликреиновая система

- Кинин-калликреиновая система состоит из небольших полипептидов, а также набора активирующих и деактивирующих ее компоненты *ферментов*.
- Освобождение кининов из кининогенов происходит под действием трипсиноподобных сериновых протеиназ - *калликреинов*, локализованных в плазме крови (плазменный калликреин) и в тканях некоторых органов
- Это группа белков крови, *играющих роль в воспалении, контроле артериального давления, коагуляции и возникновении болевых ощущений*. Важнейшими компонентами данной системы являются брадикинин и каллидин.
- Высокомолекулярный кининоген (ВМК) синтезируется в печени наряду с *прекалликреином*. Не обладает каталитической активностью.
- Низкомолекулярный кининоген (НМК) синтезируется местно, многими тканями и секретируется вместе с *тканевым калликреином*.
- Прекалликреин - предшественник калликреина плазмы крови является *гликопротеидом, представленным одной пептидной цепью, состоящей из 619 аминокислотных остатков*. Синтезируется прекалликреин в гепатоцитах.

# Кининогены

- В плазме крови человека присутствуют два кининогена: **высокомолекулярный кининоген (ВМК)** и **низкомолекулярный кининоген (НМК)**, синтез которых кодируется единым геном, локализованным в хромосоме 3.
- Ген кининогена содержит 11 экзонов, девять из них образуют три триплетных экзона. Экзон 10 содержит общую для двух кининогенов кининовую последовательность (экзон 10a) и особую C - концевую последовательность ВМК (экзон 10b), а экзон 11 кодирует уникальную C - концевую последовательность НМК. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта кининогенового гена образует две различные мРНК, специфичные соответственно для ВМК и НМК
- Кининогены могут обратимо связываться с тромбоцитами, нейтрофилами и эндотелиальными клетками.
- Во всех случаях для связывания кининогенов с клетками необходим  $Zn^{2+}$ . При связывании с клетками ВМК контролирует их функции. Взаимодействие ВМК (D3) с тромбоцитами, скорее всего через тромбоспондин, **угнетает активность тромбоцитарного кальпаина и подавляет агрегацию тромбоцитов**, стимулированную тромбином, препятствуя тем самым связыванию последнего с клетками

# Внутренний путь

Связывание фактора XII (фактора Хагемана) с компонентами субэндотелиального слоя, активированными тромбоцитами, мицеллами из фосфолипидов или бактериальными полисахаридами изменяет его конформацию, вследствие чего:

- 1) он становится чувствительным к расщеплению калликреином;
- 2) в комплексе с кининогеном повышает активацию прекалликреина, т.е. образуется большое количество активированного фактора XII (XIIa)

Начальный этап – расщепление фактора XII по Arg353 с образованием фермента, состоящего из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. Протеазная активность находится в легкой цепи, а в тяжелой – домены взаимодействия.

Калликреин может расщеплять фактор XII далее по Arg334 и Arg343, что приводит к потере второй цепи и способности взаимодействовать с партнерами.

# Активация фактора XI

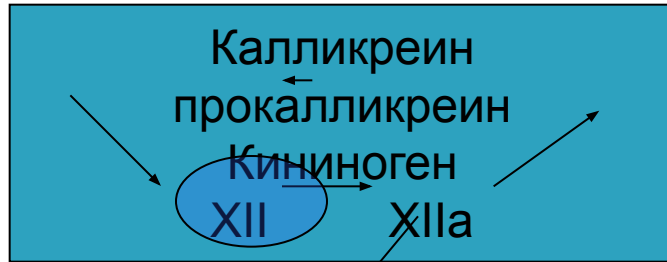
- ▣ Далее **фактор XIIa активирует фактор XI, расщепляя в нем связь с Arg369, образуя легкую и тяжелую цепи, соединенные дисульфидными мостиками (как и в случае с калликреином).**
- ▣ **Наследственный дефицит фактора XII и каллекреина не проявляется как повышенная кровоточивость**

# Активация фактора IX и гемофилии

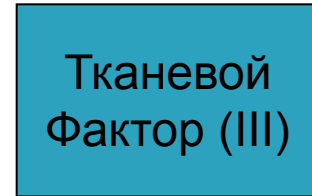
- Фактор IX активируется в результате расщепления связей Arg145-Ala146 и Arg180-Val181 с освобождением пептида активации. Может происходить как под действием  $XIa$ , так и комплекса фактора VII с тканевым фактором в присутствии  $Ca$ , причем оба пути примерно одинаково эффективны. Симптомы кровоточивости у больных с дефицитом фактора XI менее выражены, чем у больных с дефицитом факторов IX или VIII, что свидетельствует об их физиологической значимости.
- Существуют два типа гемофилии, которые обусловлены различными молекулярными дефектами. У пациентов с гемофилией А отсутствует, снижен или нарушен синтез фактора свертывания VIII, а у пациентов с гемофилией В (болезнь Кристмаса) аналогичные нарушения касаются фактора свертывания крови IX. Распространенность гемофилии А — 1:10 000 мужского населения, гемофилии В — 1:30 000-1:50 000

# Схема основных реакций активации свертывания крови

## Внутренний путь



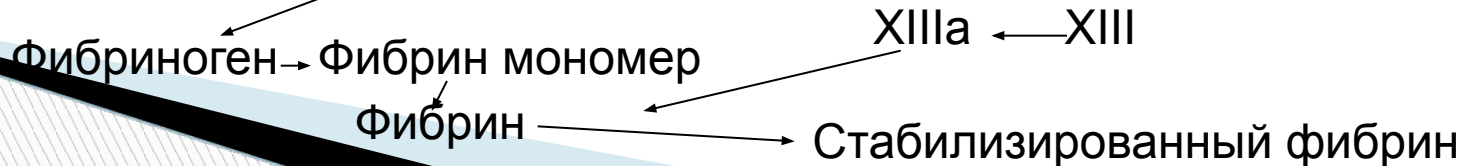
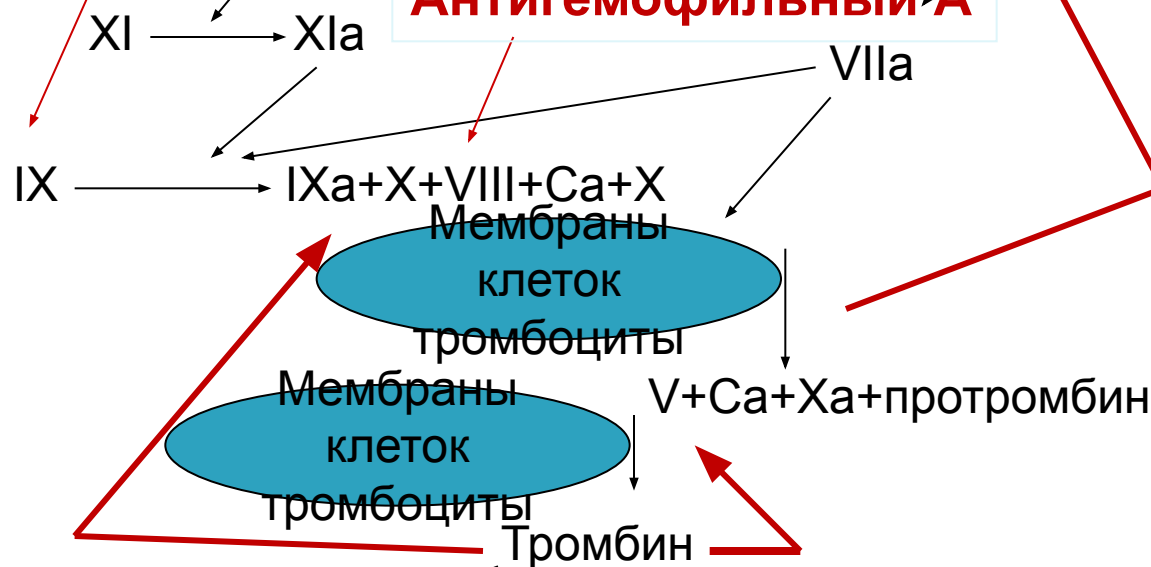
## Внешний путь



Появляется при повреждении ткани

**Антигемофильный В**

**Антигемофильный А**





# Активация фактора X

- Активация фактора X под действием фактора IXa происходит на поверхности фосфолипидов при участии ионов Ca и фактора VIIIa, который обеспечивает связывание и оптимальное взаимодействие факторов XIa и X, увеличивая скорости реакции в 100 000 раз.
- И вновь фактор X состоит из двух цепей, взаимодействующих за счет образования дисульфидных связей, образуются они вследствие расщепления связей Arg139-Arg140 и/или Arg142-Ser143. Активация фактора X происходит вследствие расщепления связи Arg194-Ile195 в N-концевой части цепи с освобождением пептида активации. Другой важный компонент активации фактора X – комплекс тканевого фактора и фактора VIIa

# Внешний путь активации

- При контакте крови с клетками, экспрессирующими тканевой фактор (ТФ), фактор VII связывается с ТФ с  $K_d$  3 нм. Образование комплекса увеличивает чувствительность фактора VII к протеолизу, приводящему к расщеплению связи Arg152-Ile153. Активация происходит под действием следов факторов X и IX, а также вследствие аутоактивации. В плазме около 1% фактора VII постоянно находится в двухцепочечной форме, которая без ТФ не ингибируется антитромбином III и не может активировать свои естественные субстраты: факторы X и IX.
- Фактор VII может активироваться и под действием фактора XIIa

# Образование тромбина

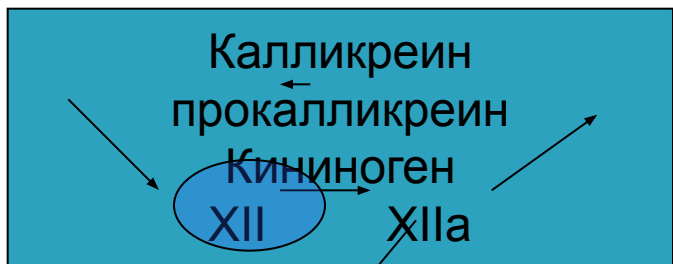
- Фактор X, активированный на поверхности фосфолипидов комплексом IXa-VIIIa или комплексом фактор VIII- TF, образует комплекс с фактором V и протромбином (фактор II). В результате последовательного расщепления двух связей в молекуле протромбина (Arg320-Ile321) образуется мейзотромбин, состоящий из двух половин молекулы, соединенных дисульфидной связью.
- Мейзотромбин связывается с протеином C и активирует вазоконстрикцию. После гидролиза в мейзотромбине связи Arg271-Thr образуется N-концевой фрагмент активации протромбина и молекула α-тромбина, состоящая из двух цепей, соединенных дисульфидной связью. А цепь состоит из 49 аминокислот, но у человека от нее может отщепляться 13 аминокислот без изменения активности. Протеазный и субстрат-связывающие центры находятся на В-цепи (259 аминокислот).
- После протеолиза тромбин диссоциирует из комплекса и обеспечивает следующие функции: прокоагулянтную, антикоагулянтную, вазоактивную и митогенную. Он обеспечивает превращение фибриногена в фибрин и активирует фактор XIII, стабилизирующий фибрин. Кроме того, он активирует свое образование, оказывая прокоагулянтное действие.

# Положительные обратные связи

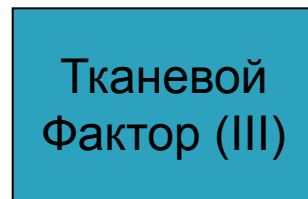
- Тромбин ускоряет свое образование, активируя тромбоциты, факторы V и VIII, и возможно VII и IX. Он самый мощный из факторов активации тромбоцитов, это **ведущий путь образования артериальных тромбов**. Активация происходит через мембранный рецептор **тромбомодулин** – протеогликан сосудов, являющийся рецептором для тромбина (7TM), от которого отщепляется N-концевой пептид, активирующий рецептор. В этом случае одна молекула может активировать несколько рецепторов. Уровень тромбомодулина значительно снижен при некоторых заболеваниях, таких как **атеросклероз**, что увеличивает свёртываемость крови и повышает риск тромбоза.
- В двух ключевых **реакциях факторы Va и VIIIa обеспечивают образование на поверхности мембраны комплексов, в которых каталитическая эффективность  $k_{cat}/K_m$  увеличивается в сотни тысяч раз**. Способность к образованию фосфолипид-зависимых комплексов появляется после расщепления в этих факторах минимум трех связей. Активация фактора VIII необходима для его диссоциации из комплекса с vWF.
- Положительные обратные реакции факторов Xa и IXa – активация фактора VII.

# Схема основных реакций активации свертывания крови

## Внутренний путь



## Внешний путь



Появляется при повреждении ткани

Антигемофильный В

XI → XIa

Антигемофильный А

VIIa

IX → IXa+VIII+Ca+X

Мембраны клеток тромбоциты

V+Ca+Xa+протромбин

Мембраны клеток тромбоциты

Тромбин

Фибриноген → Фибрин мономер

Фибрин

XIIIa ← XIII

Стабилизированный фибрин



# Функции фосфолипидов

- **Ограничение свертывания крови участком повреждения** достигается за счет локализации участников реакции на поверхности поврежденных или стимулированных клеток. При этом необходимо участие клеток, содержащих ТФ, и активированных тромбоцитов.
- Наружный слой мембраны содержит холиновые фосфолипиды, внутренний - **фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, обладающие прокоагулянтными свойствами**. Асимметричное распределение определяется флиппазой и АВС-транспортером. Повышение внутриклеточной концентрации Са ингибирует транспортер, что снижает поверхностный уровень прокоагулянтных фосфолипидов.

# Система противосвертывания:

- ▣ **Аннексин V**: секретируется из эндотелиальных клеток и оказывает локальное антикоагулянтное действие, связываясь с прокоагулянтными фосфолипидами (напр. с фосфатидилсеринем)
- ▣ **Ингибиторы сериновых протеаз**: в основном из семейства «серпинов», кроме того, ИПТФ (ингибитор пути тканевого фактора) и  $\alpha$ -макрोगлобулин.



# Серпины

- Серпины (включая овальбумин, ангиотензиноген, тироксин-связывающий белок) состоят из около 400 аминокислот, различия в м.м. обусловлены гликозилированием. Многие из них (но не все) являются ингибиторами сериновых протеаз (так называемые ингибиторы-«самоубийцы»). Участок взаимодействия с протеазами находится в С-концевой части молекулы, N-концевая обычно отщепляется. В случае антитромбина это приводит к изменению связывания гепарина.
- Механизм действия заключается в **образовании стехиометрического комплекса протеаза-ингибитор, в котором после расщепления получающийся пептид остается ковалентно связанным с серином активного центра.** Комплекс выводится из кровотока и разрушается.

# Антитромбин III

- Антитромбин III **ингибирует все протеазы системы свертывания**, а также плазмин, трипсин и C1s компонент системы комплемента.
- Состоит из 442 аминокислот, содержит три S-S связи и 4 участка гликозилирования. **Ковалентно связывается с Ser активного центра протеаз. Скорость ингибирования существенно повышается в присутствии сульфатированных сахаров**, в частности **гепарина** (минимально необходимым является пентасахар).
- В антитромбине III **петля, содержащая активный центр, частично погружена внутрь белка, она экспонируется наружу после взаимодействия с гепарином.**
- Антитромбин III связывается с гепарином стехиометрически с высоким сродством за счет взаимодействия с положительно заряженными остатками Arg47, Lys125, Arg129, Arg132, Lys133. За счет связывания с гепарином увеличивается константа скорости ингибирования: от 1 Mc(-1) до 10(7) mc(-1).
- В кровеносных сосудах функцию гепарина могут осуществлять **гликозаминогликаны и гликопротеины поверхности эндотелия.**

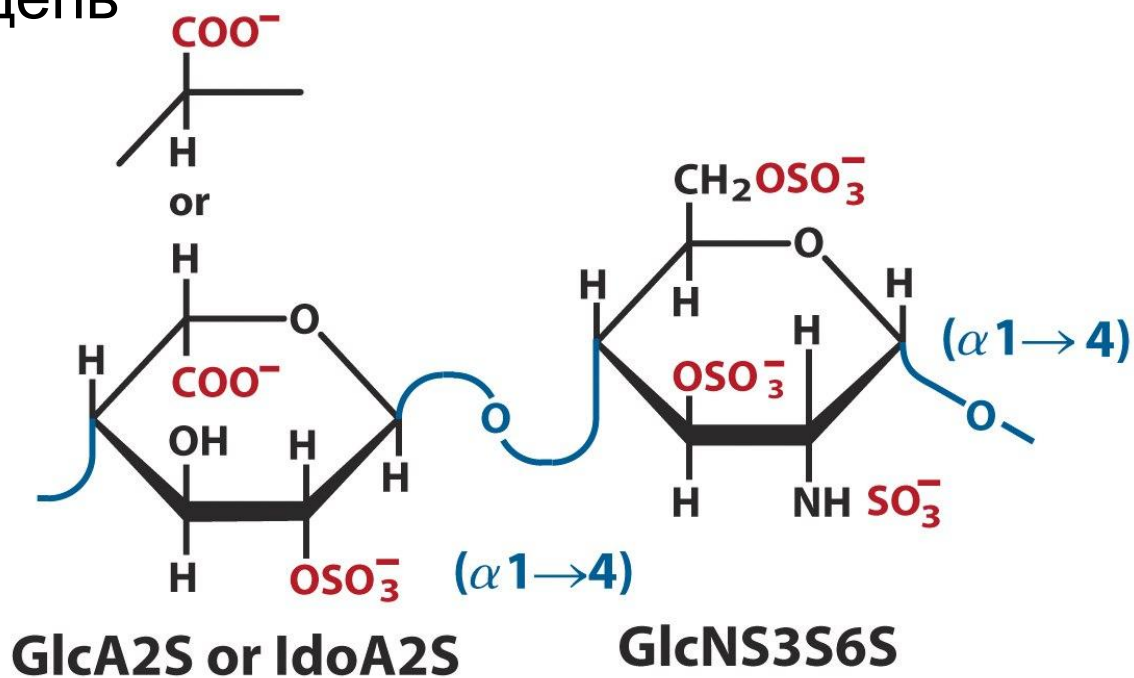
# Гепарин

Глюкозаминоглик  
ан

Повторяющиеся дисахариды

Число  
дисахаридов  
на цепь

Гепарин  
15-90



# Гиалуроновая кислота

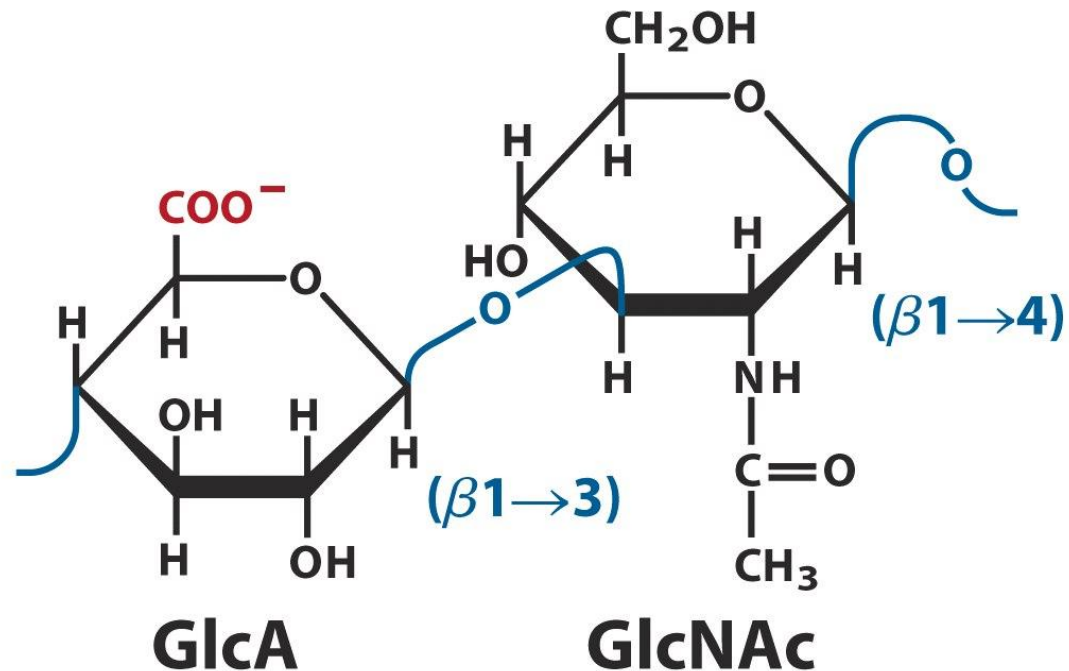
Glycosaminoglycan

Repeating disaccharide

Number of  
disaccharides  
per chain

Hyaluronate

~50,000



# Дефицит антитромбина

- Частота наследственного **дефицита антитромбина III** в популяциях (аутосомно-доминантный признак) составляет 1/2000-5000. Клинические проявления – **тромбозы глубоких вен и тромбоэмболия легочной артерии**.
- Вероятность тромботических осложнений в 15 лет менее 10%, **после 50 лет около 85%**. При этом травмы, операции, инфекции и иммобилизация увеличивают риск тромбоза.
- **Тип I дефицита** – снижена активность и концентрация антитромбина III
- **Тип II** – концентрация в пределах нормы, но изменены свойства: мутация Pro429-Leu (Ia) приводит к тому, что не образуется дисульфидная связь, что изменяет способность к взаимодействию с протеазами и гепарином, в двух других группах нарушено взаимодействие с протеазами (IIb), либо с гепарином (IIc).
- Приобретенный дефицит – снижение синтеза (заболевания печени), либо повышенные потери белка в результате нефротического синдрома и заболевания ЖКТ.

# Система протеина С

- **Протеин С** – профермент, который после активации тромбином расщепляет факторы Va и VIIIa, **прерывая каскад**
- **Тромбомодулин** - трансмембранный гликопротеид (557 аминокислот). На N-конце молекулы имеется домен, гомологичный лектинам, за ним 6 EGF-доменов, участки гликозилирования и ТМ домен. Связывает тромбин с высоким сродством (за счет взаимодействия с EGF 5 и 6 и углеводной цепью).
- Связывание тромбина с ТМ **увеличивает эффективность реакции активации ПрС примерно в 20000 раз** и ингибирует прокоагулянтные свойства тромбина: это уменьшает активацию тромбоцитов и фактора V. Стимулирует разрушение тромбина лизосомальными ферментами.

# Протеин S

- ▣ Увеличивает скорость инактивации протеином S факторов Va и VIII в составе протромбиназного комплекса с X -фактором, но только в присутствии фосфолипидов.



# Дефицит протеина С и S

- Дефицит этих белков приводит к развитию **венозных тромбозов и тромбоэмболии**. При гетерозиготной форме тромбозы появляются после 14 лет, но вероятность их развития увеличивается с возрастом, а также при травмах, операциях, иммобилизации и использовании пероральных контрацептивов. При дефиците этих факторов увеличивается риск тромбофлебитов, при дефиците прС/прS - риск тромбозов при беременности у носителей генов, обеспечивающих дефицит антитромбина III.
- Частота 1 на 300 человек.

# Резистентность к протеину С и тромбозы

- ▣ Резистентность к протеину С отмечается у 10-20% больных, страдающих тромбозом глубоких вен. Наиболее часто причина – замена Arg 506 на Gln, а также наличие полиморфных участков в экзоне 13 гена протеину С.

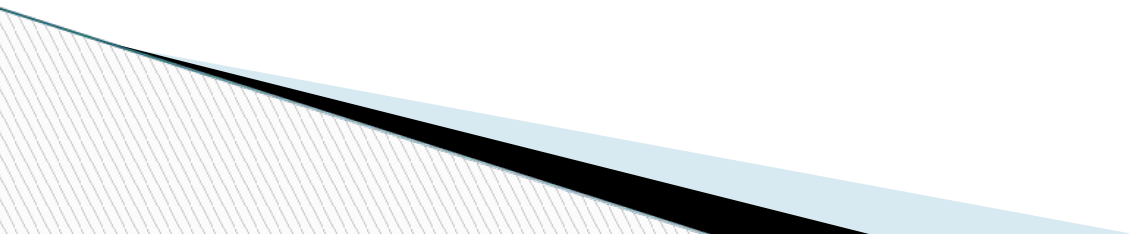
# Система фибринолиза: плазминоген и плазмин

- Фермент, расщепляющий фибрин – **плазмин**, образуется при активации плазминогена (24 S-S связи, 5 крингл-доменов).
- Крингл-домены связывают плазминоген с фибрином. От молекулы плазмина освобождается N-концевой пептид, что активирует гидролиз фибрина. Рабочая форма плазмина – две цепи с соединенные дисульфидными связями. Наиболее чувствительна к протеолизу плазмином C-концевая часть цепи фибрина. Полная потеря свертываемости – после отщепления одного из D-доменов, являющегося периферическим участком полимеризации.
- Один из тканевых **активаторов плазминогена – урокиназа** (протеаза, содержащая EGF, крингл и каталитический домен).
- Культура гемолитического стрептококка **производит стрептокиназу**, образующую комплекс с плазминогеном, в результате чего формируется активный центр протеазы.

# Серпины – ингибиторы протеаз

- ▣ **Серпины** — группа белков, которые имеют определённое структурное сходство между собой и многие из которых ингибируют сериновые протеазы. Получили название ингибиторы-самоубийцы. Они связываются с активным центром протеаз, происходит первая стадия реакции (ацилирование серина), однако последующий конформационный переход не происходит, вследствие чего С-концевая часть расщепляемого полипептида оказывается ковалентно связанной с протеазой, вследствие чего она необратимо инактивируется. Среди серпинов такие белки как  $\alpha$ -антитрипсин;  $\alpha$ -антихимотрипсин;  $\alpha$ -антиплазмин; антитромбин, транскортин, тироксин-связывающий глобулин, ангиотензиноген.

# Приложение – механизм действия сериновых протеаз



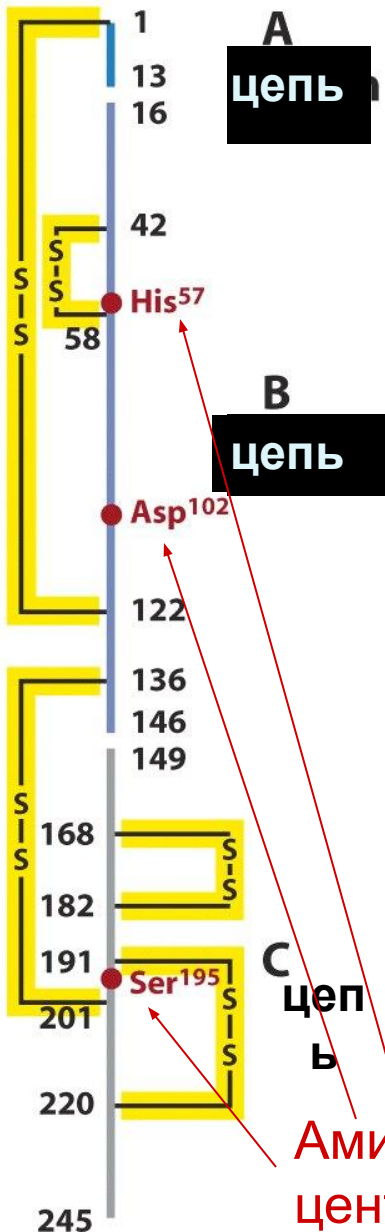
# Специфичность действия различных пептидаз (приложение)

- |                             |                    |
|-----------------------------|--------------------|
| •Трипсин                    | Lys, Arg (С-конец) |
| •Химотрипсин                | Phe, Trp, Tyr (С)  |
| •V8 (Staphylococcus aureus) | Asp, Glu (С)       |
| •Пепсин                     | Phe, Trp, Tyr (N)  |

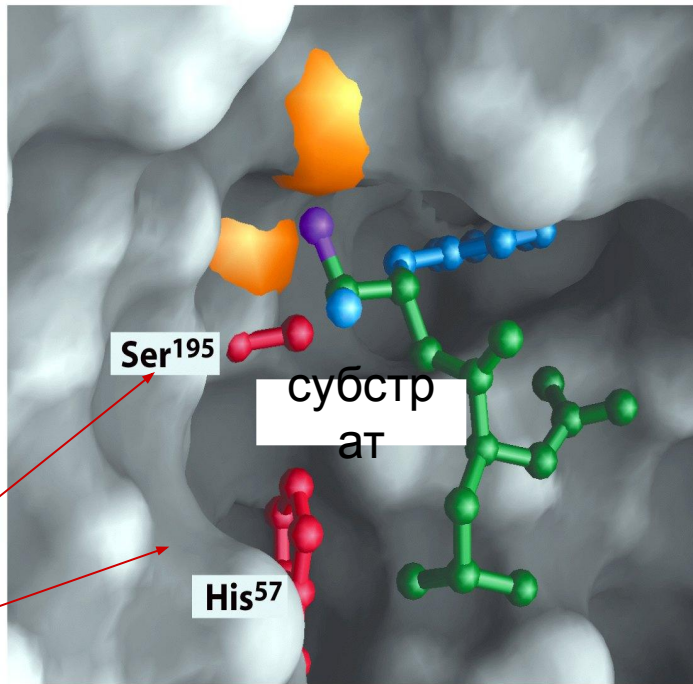
# Механизм действия химотрипсина (приложение)

*Химотрипсин* – протеаза, катализирующая гидролиз пептидной связи, рядом с которой находится ароматическая аминокислота (Trp, Phe, Tyr). Реакция, катализируемая химотрипсином, иллюстрирует принцип *стабилизации переходного состояния* и является классическим примером *общего кислотно-основного катализа* и *ковалентного катализа*.

Каталитический цикл состоит из двух фаз, в первой из которых разрывается пептидная связь субстрата и образуется эфирная связь между карбонильным углеродом пептида и ОН-группой Ser<sup>195</sup>: формируется ацил-фермент (интермедиат). Во второй фазе происходит гидролиз эфирной связи регенерация свободного фермента

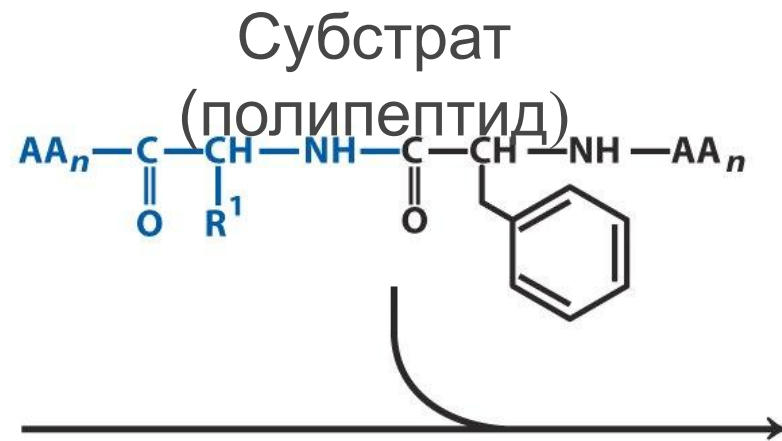
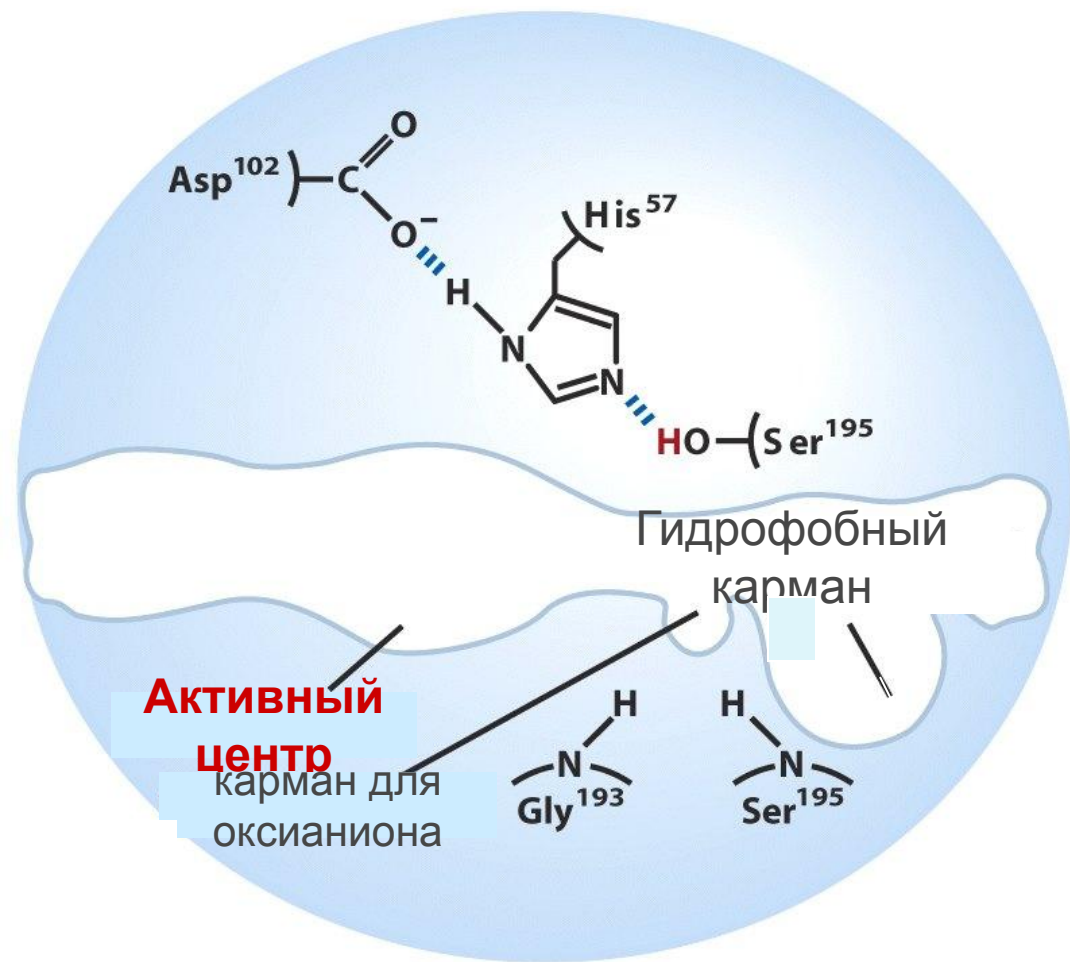


**Аминокислоты активного центра химотрипсина**



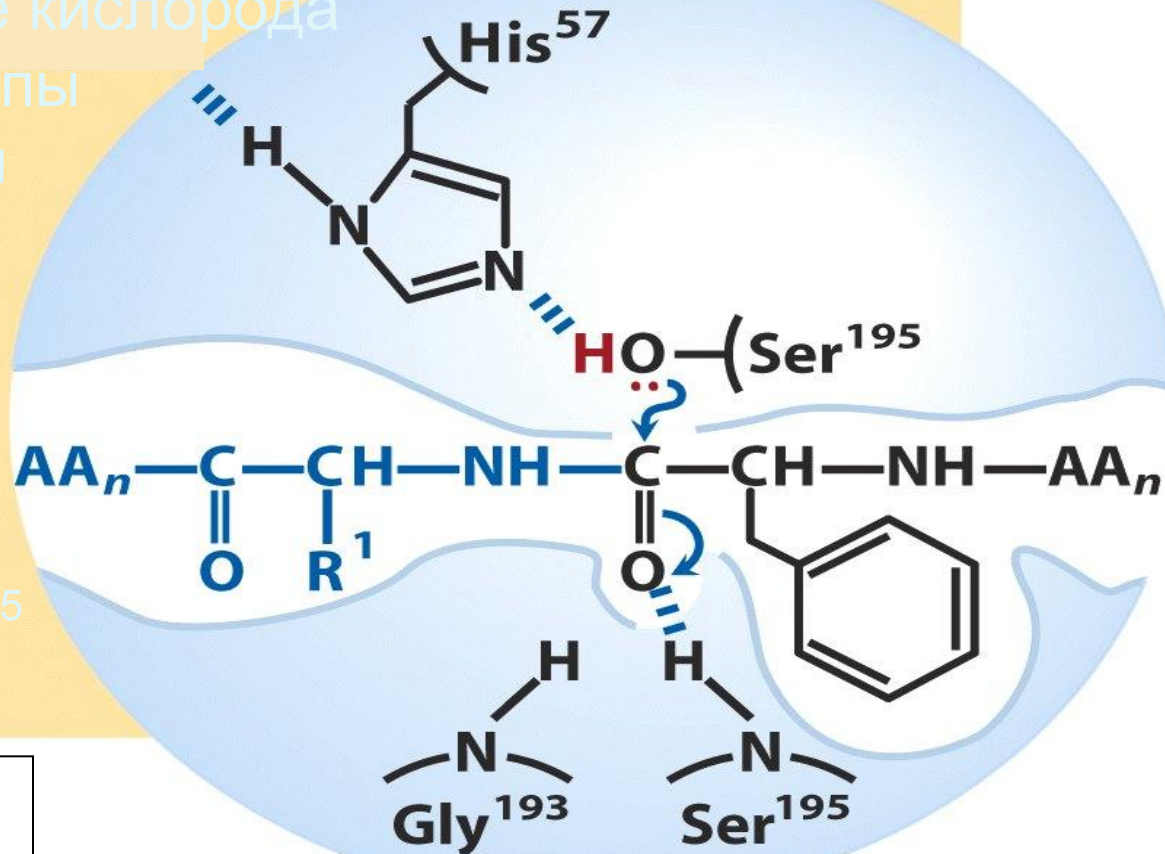


# Активный центр и субстрат ХИМОТРИПСИНА



# Стадия 1: образование комплекса ES

Взаимодействие Ser<sup>195</sup> и His<sup>57</sup> приводит к образованию сильного нуклеофила (электронная пара кислорода), который атакует карбонильную группу пептида, образуя тетраэдрический ацил-фермент. На атоме кислорода карбонильной группы сосредотачивается короткоживущий отрицательный заряд, который стабилизируется атомами H от NH групп Gly<sup>193</sup> и Ser<sup>195</sup>



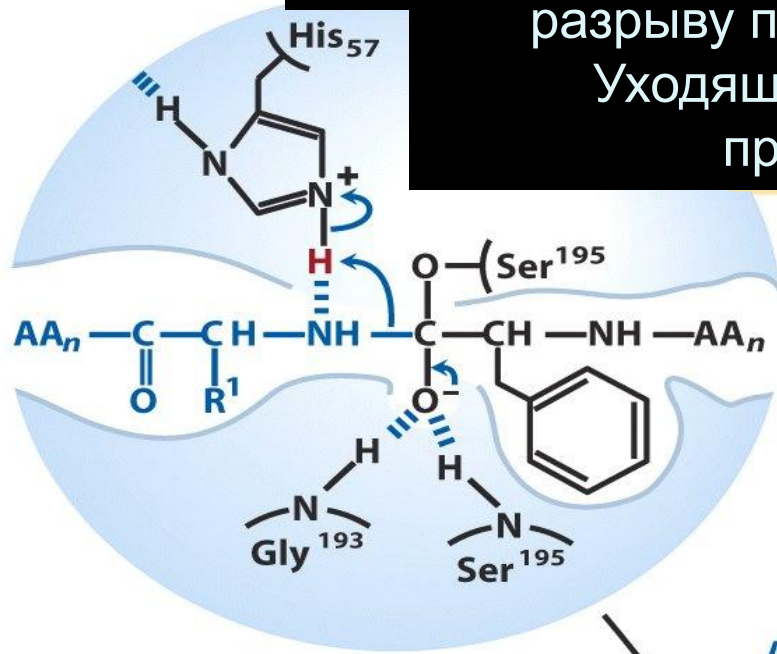
**ES**

КОМПЛЕКС

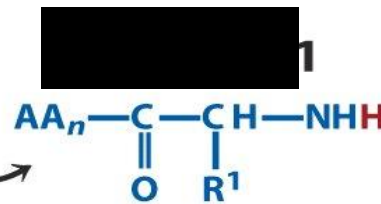
# Стадия 2: освобождение продукта 1

Нестабильность, обусловленная наличием заряда на карбонильном кислороде субстрата, приводит к распаду тетраэдрического комплекса с восстановлением двойной связи кислорода с углеродом и разрыву пептидной связи.

Уходящая иминогруппа протонируется His<sup>57</sup>



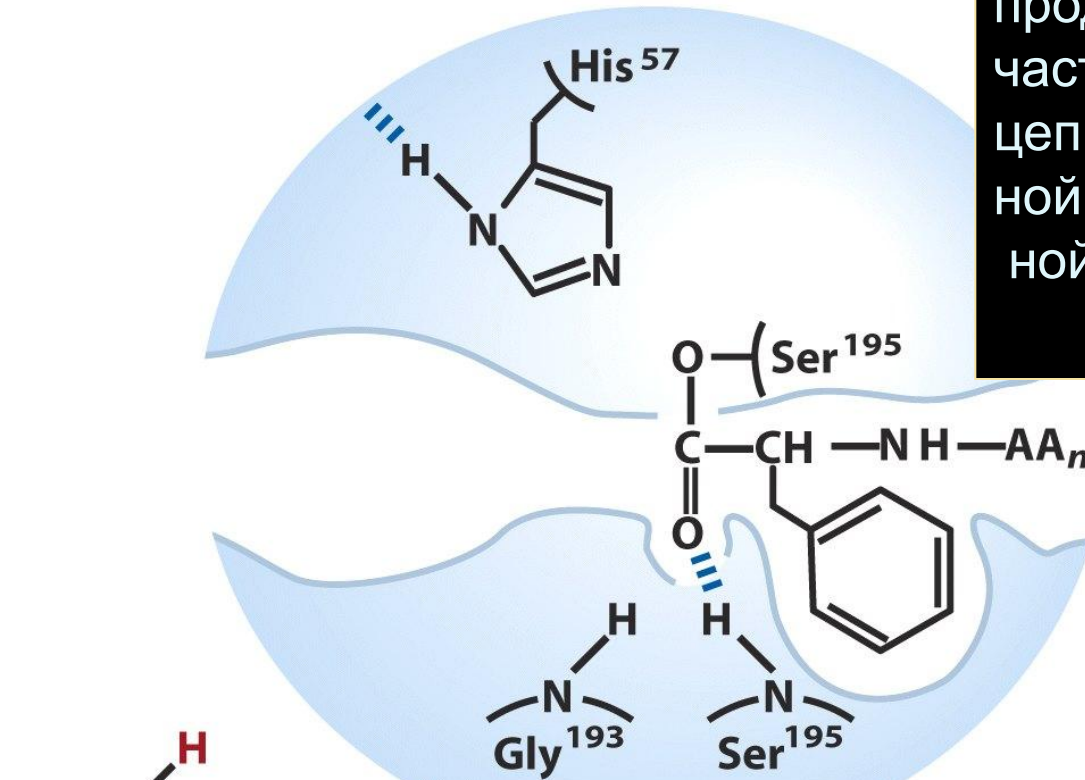
См. следующий слайд



Продукт 1

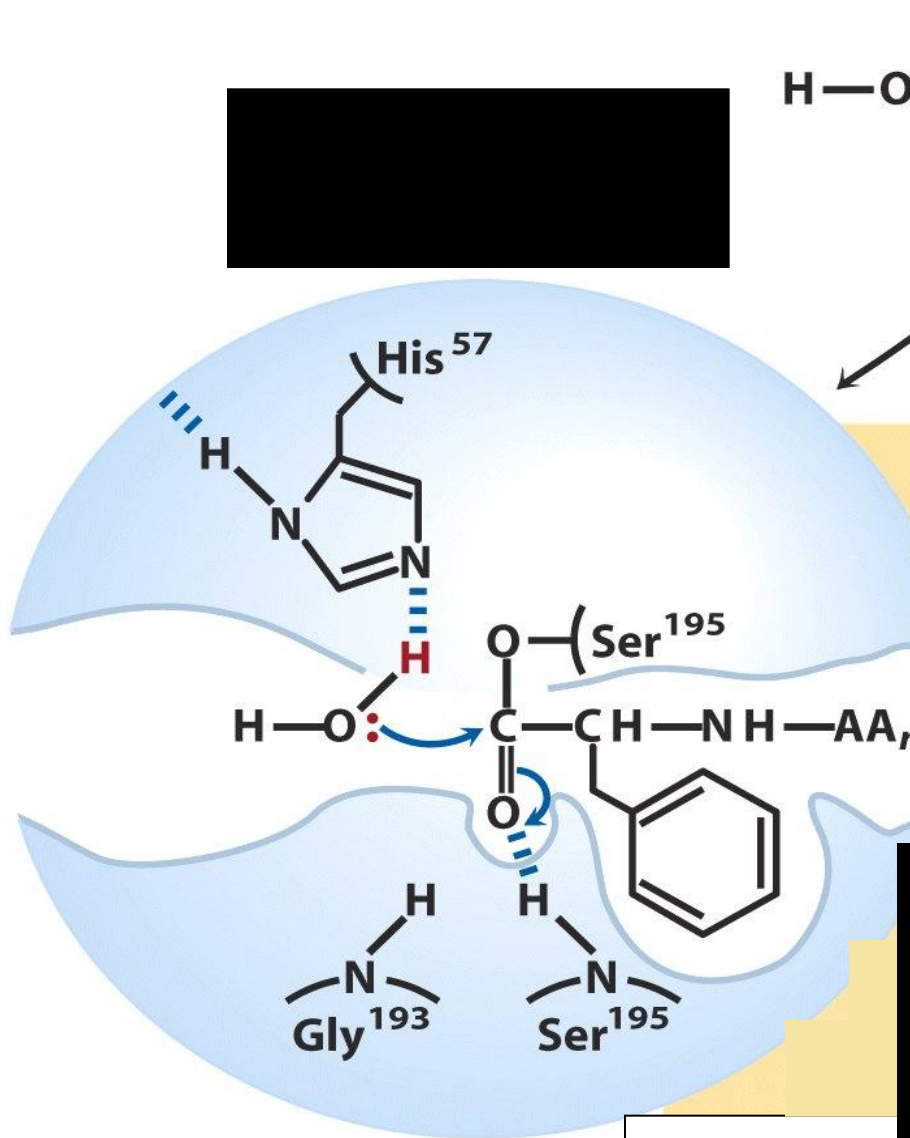
# Стадия 3: образование ацилфермента

После ухода первого продукта оставшаяся часть полипептидной цепи остается связанной с Ser<sup>195</sup> ковалентной связью (ацилфермент).



**Ацилированный фермент**

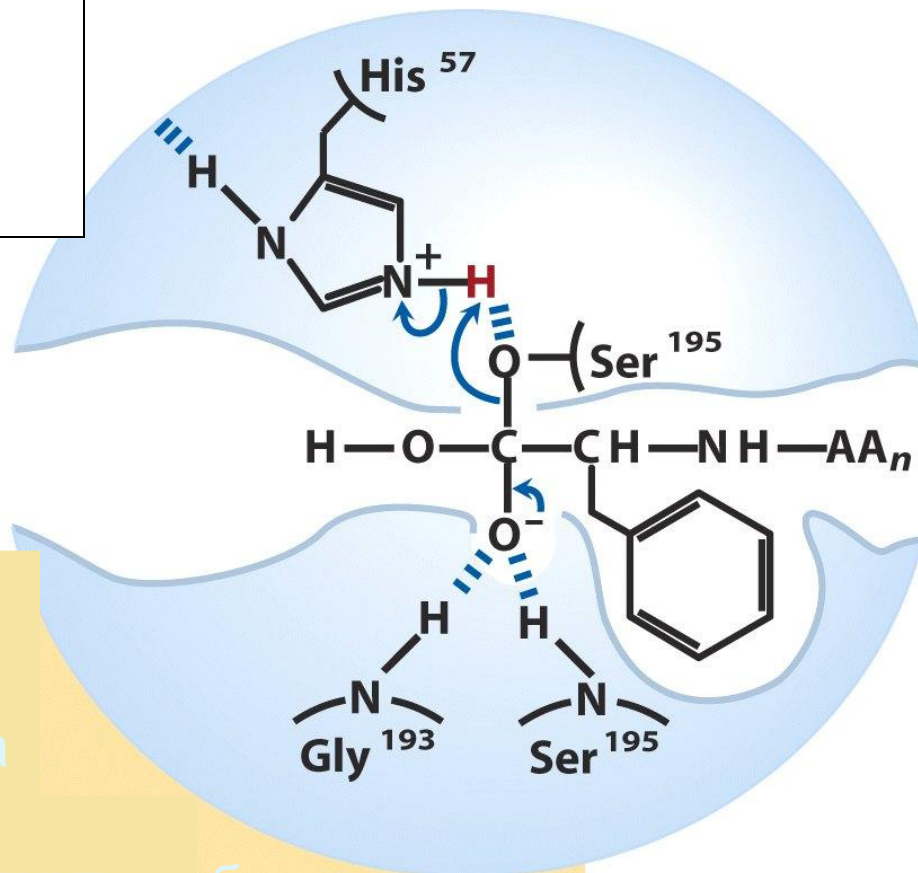
# Стадия 4: связывание воды



Приходящая молекула воды депротонируется за счет взаимодействия с His<sup>57</sup>, образуя нуклеофильный гидроксид-ион. Этот ион атакует эфирную связь ацилфермента: образуется второй тетраэдрический интермедиат с кислородом, несущим отрицательный заряд



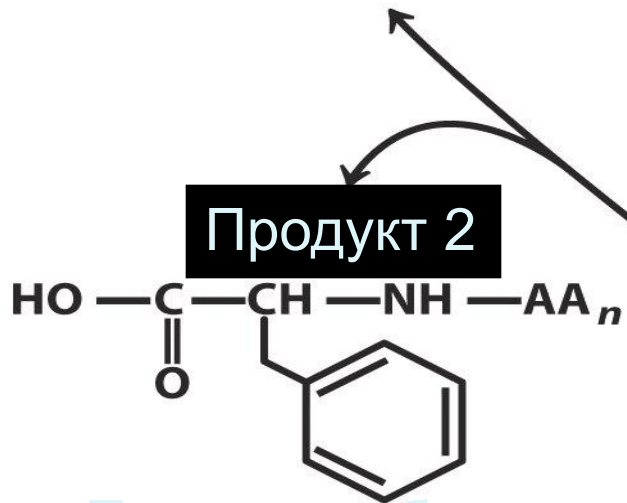
# Стадия 5: деацилирование



При распаде второго интермедиата образуется продукт, карбогидрат-анион, и H от His<sup>57</sup> перемещается к Ser<sup>195</sup>.

# Стадия 6: образование комплекса фермент-продукт и освобождение пр

Комплекс фермент-продукт



После освобождения второго продукта происходит регенерация свободного фермента

