

# Лекция 9.

## 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 является:
- 1) следствием 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.

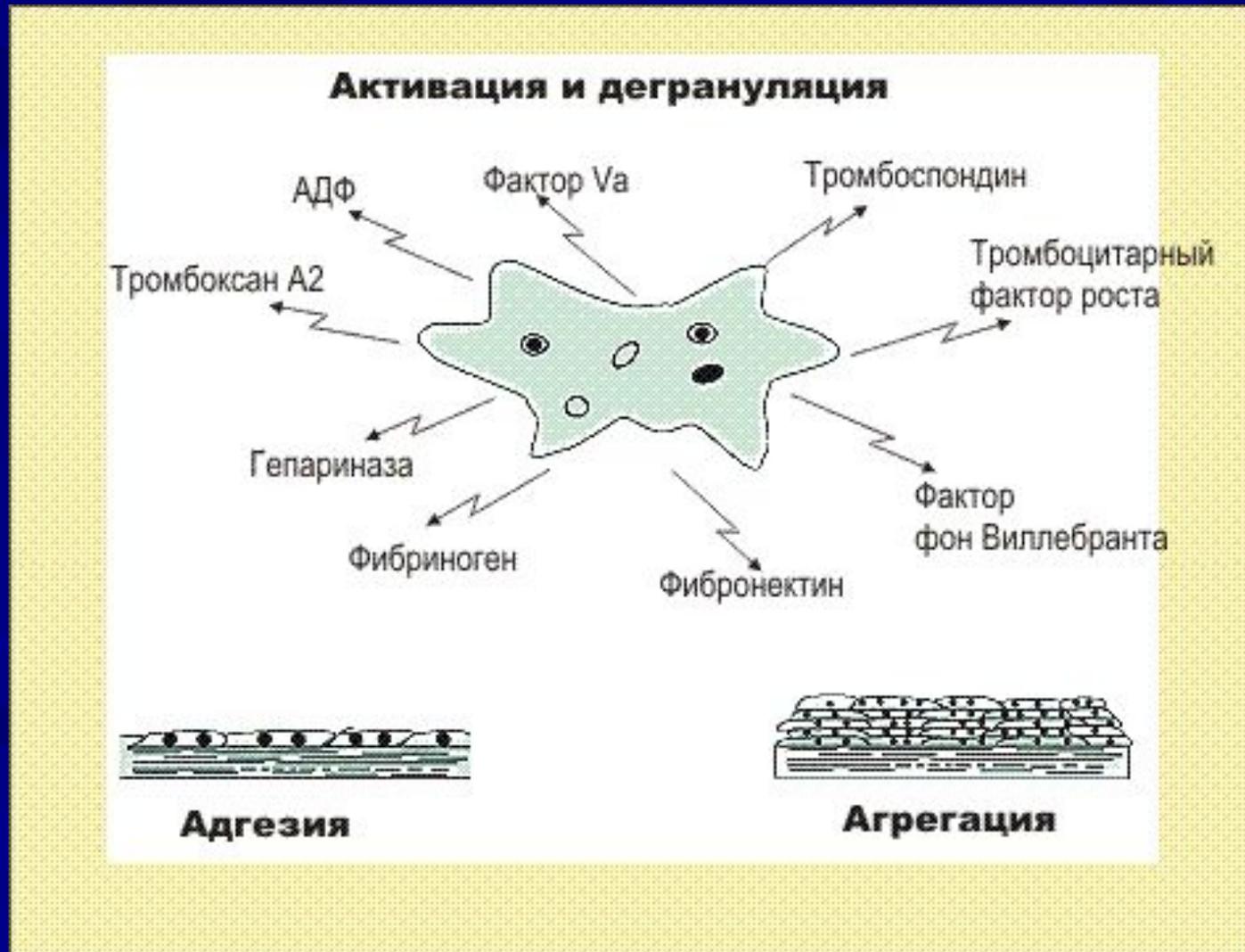
# Система гемостаза

- Система гемостаза – одна из защитных систем 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 тромбоцитов

- Первый этап в процессе свертывание крови - адгезия (прилипание тромбоцитов к месту повреждения, например, к субэндотелиальному слою). После этого происходит активация и дегрануляция тромбоцитов (далее показаны некоторые из веществ, выделяемых тромбоцитами).
- На последнем этапе происходит агрегация тромбоцитов (связывание активированных тромбоцитов с прилипшими к месту повреждения тромбоцитами).

# Активация тромбоцитов и секреция тромбоцитарных факторов



# Факторы системы свертывания крови

- В системе свертывания крови имеются **плазменные** и **тромбоцитарные** факторы
- В активированной форме 6 плазменных факторов крови и калликреин – это сериновые протеазы. Механизм свертывания 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, аминокислотные последовательности в этих областях гомологичны таковым для трипсина и химотрипсина (механизм действия химотрипсина дан в приложении в конце).
- Селективность действия протеаз в системе гемостаза обеспечивается структурой N-концевых частей молекул.

# Факторы системы свертывания крови

| Название                             | Мол. масса | время     | Функция                  |
|--------------------------------------|------------|-----------|--------------------------|
|                                      | кДа        | полужизни |                          |
| 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-<br>мофильный A) | 330        | 10 ч      | кофактор                 |
| Фактор IX (антиге-<br>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-<br>цитарный)    | 150        | 12 дн     | профермент               |
| Прекалликреин<br>(плазменный)        | 80         |           | ф-р контактной активации |
| <b>ВМК</b>                           | 110        |           | ф-р контактной активации |

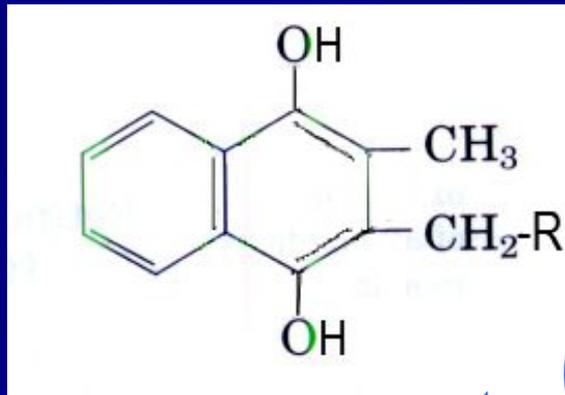
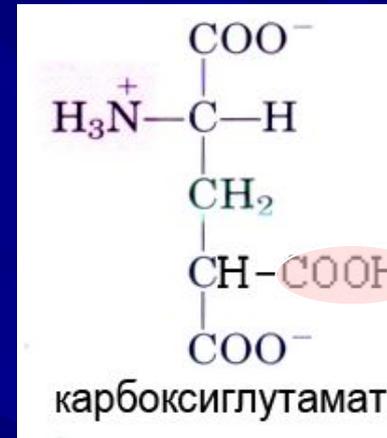
# Структура N-концевых частей молекул факторов плазмы крови

- В N-концевой части протромбина (II), факторов VII, IX, X, а также протеинов G и S содержится до 12 остатков  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, образующейся вследствие посттрансляционного  $\gamma$ -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)

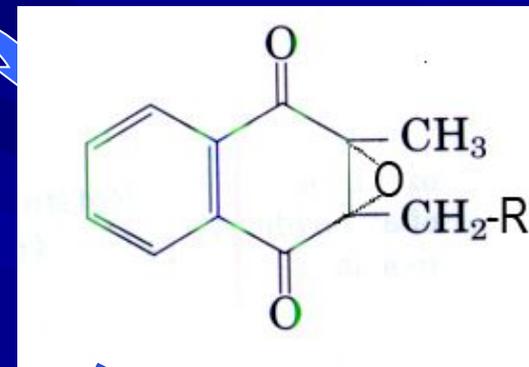
# Карбоксилирование глутамата



карбоксилаза



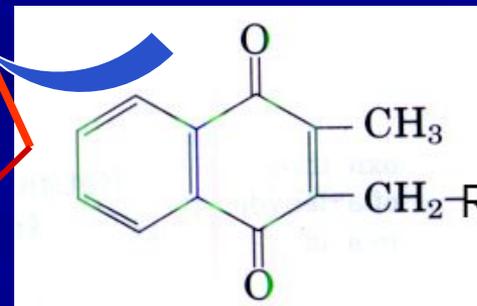
эпоксиредуктаза



S-S



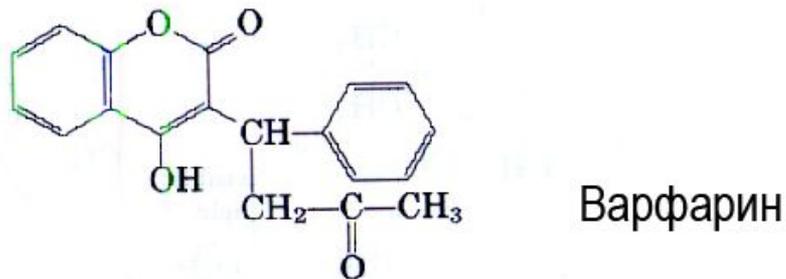
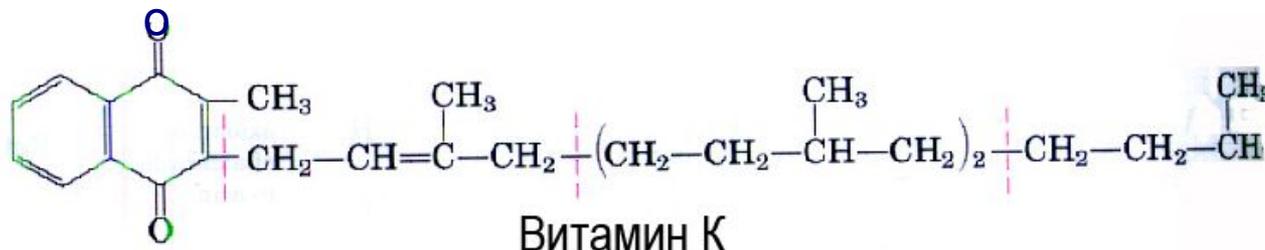
Антагонисты витамина К  
(варфарин)



Антагонисты витамина К

S-S

# Витамин К и его антагонист

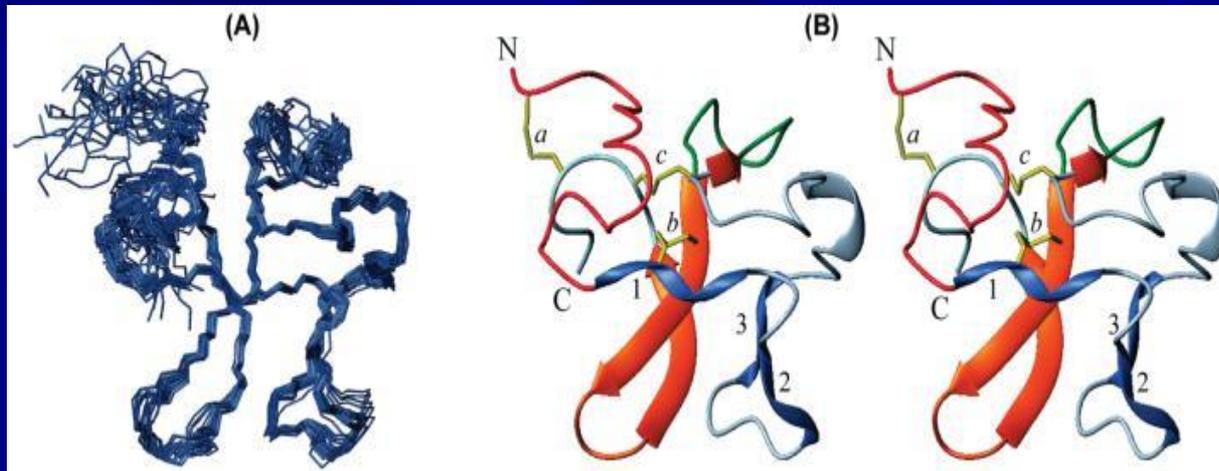


Варфарин применяется в медицине для терапии тромбозов

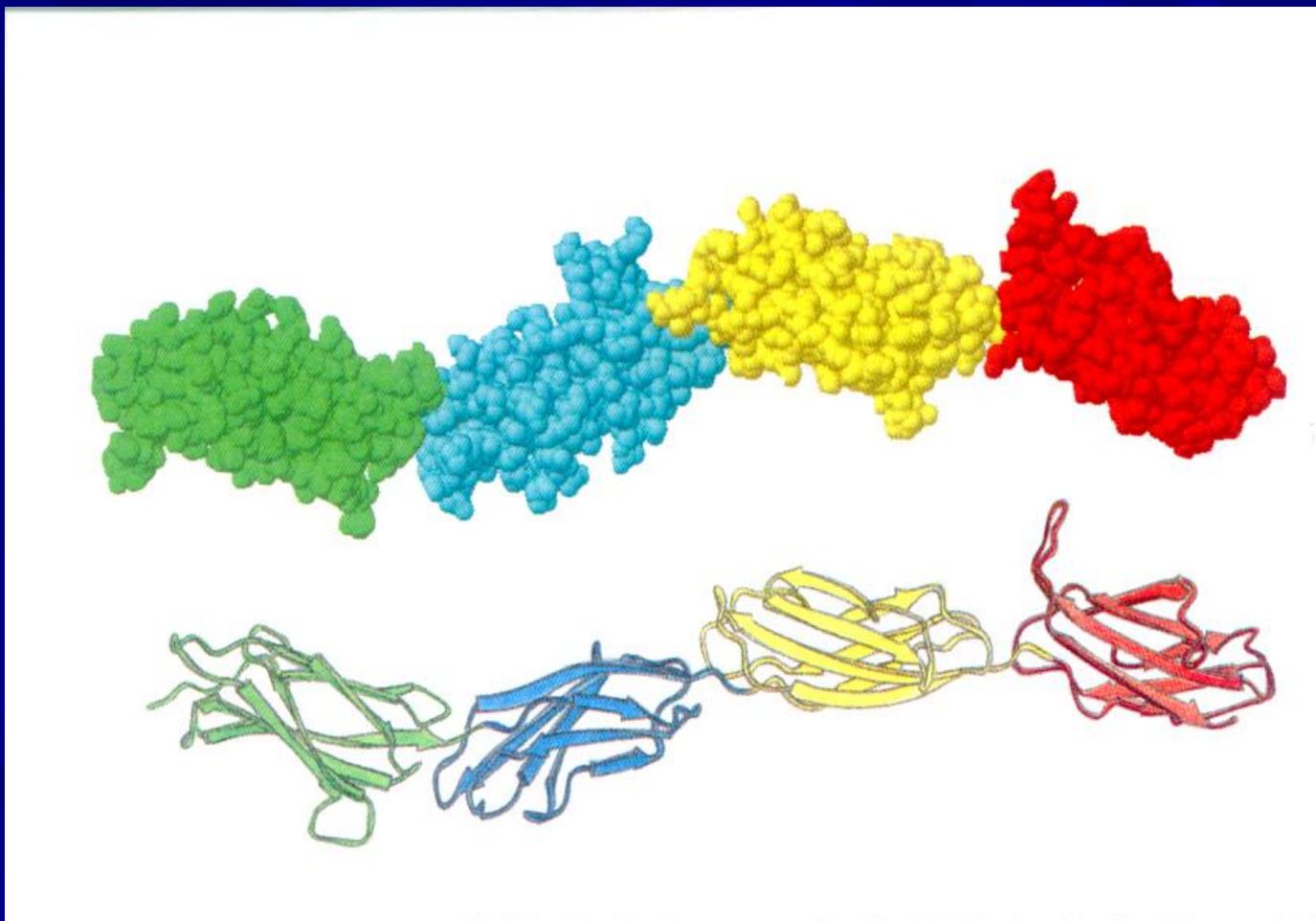
# Домены, присутствующие в факторах системы свертывания

- Крингл-домен. Протромбин (фактор XII) и ферменты системы фибринолиза содержат участки с 80 аминокислотами, имеющими форму петли в виде сплюснутого пузырька (крингл-домен). Обеспечивает взаимодействие с другими факторами гемостаза
- EGF-домен. Факторы VII, X, IX и XII содержат последовательность из 50 аминокислот, гомологичную таковой фактора роста эпидермиса (EGRF). Эти домены обеспечивают связывание факторов с рецепторами поверхности клеток или рецепторными доменами факторов V и VIII.
- 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



# Домены фибронектина





# 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 из 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.

# Белки – активаторы протеаз системы свертывания крови

- Факторы V и VIII (антигемофилийный A) выполняют сходные функции. Они обеспечивают связывание витамин K-зависимых активированных факторов IX и X с фосфолипидами. Наличие таких взаимодействий увеличивает эффективность реакций активации в 100000 раз.
- Факторы V и VIII синтезируются как полипептиды. Оба белка содержат по 2 домена, гомологичных церулоплазмину, по 2 гомологичных C-домена и большой B-домен, который отщепляется при активации факторов. Фактор VIII подвергается протеолизу в C-концевой части B-домена, в крови присутствует в виде набора гетеродимеров, взаимодействующих с ионами Ca.

# Белки – активаторы протеаз системы свертывания крови

- 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. С-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.

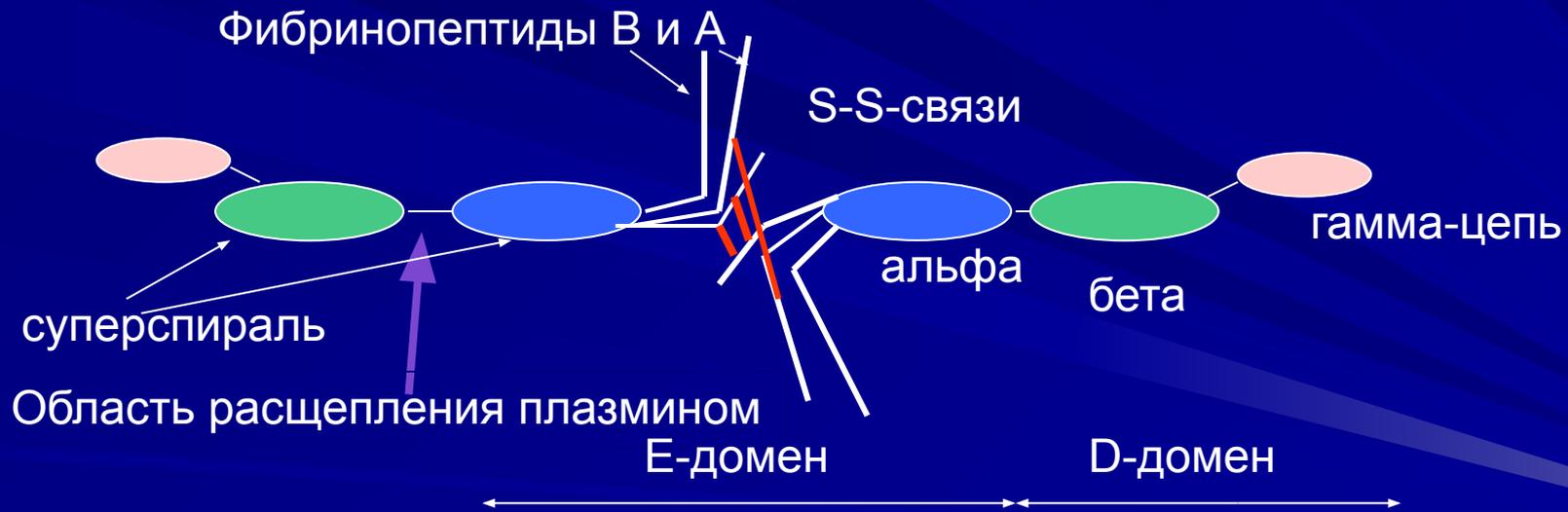


# Тканевой фактор (III)

- Трансмембранный гликопротеид, выполняющий функции рецептора фактора VII, модулирующий его активность. Активность фактора III зависит как от белка, так и от фосфолипидов мембраны клеток. Связывание одноцепочечной формы фактора VII с фактором III изменяет структуру фактора VII так, что становится возможным его расщепление на двухцепочечную форму, которая в комплексе с фактором III активирует X и XI факторы свертывания крови, 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, 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)

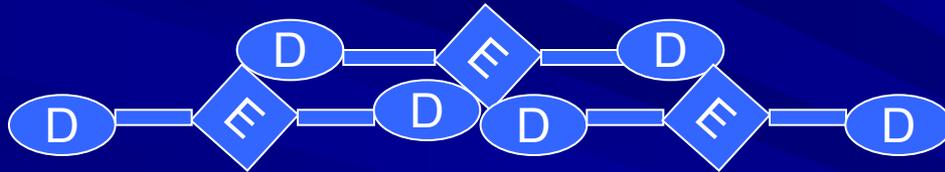
- Фибриноген состоит из трех пар неидентичных полипептидных цепей:  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  и  $\gamma$  (67, 52 и 47 кДа). Молекула фибриногена симметрична, слегка изогнута, размер 7x48 нм. N-концевые части всех трех субъединиц образуют центральную область взаимодействия двух половин молекулы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

# 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 удлиненной 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 гидроксигликованию Pro31 в  $\beta$ -цепи.
- В  $A\alpha$ -цепи 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 Са с Кд около 1 мкМ и около 10 ионов Са с Кд около 1 мМ.
- Участки высокого сродства гомологичны центрам связывания Са на кальмодулине (находятся в С-концевой области  $\gamma$ -цепи). Мутации в этой области приводят к нарушению полимеризации фибрина. С низким сродством Са 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 Са 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, его синтез 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.
- Увеличение 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.



# Кинин-калликреиновая система

- Кинин-калликреиновая система состоит из небольших полипептидов, а также набора активирующих и деактивирующих 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, 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.
- ВМК и НМК образуются в результате альтернативного сплайсинга ВМК и НМК образуются в результате альтернативного сплайсинга одного гена.
- Прекалликреин - предшественник калликреина плазмы крови является гликопротеином, представленным одной пептидной цепью, состоящей из 610 аминокислотных остатков. Синтезируется

# 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 10а) и особую С - концевую последовательность ВМК (экзон 10b), а экзон 11 кодирует уникальную С - 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 агрегации тромбоцитов, стимулированной 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, так что:

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

- Фактор XIa 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.



# 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

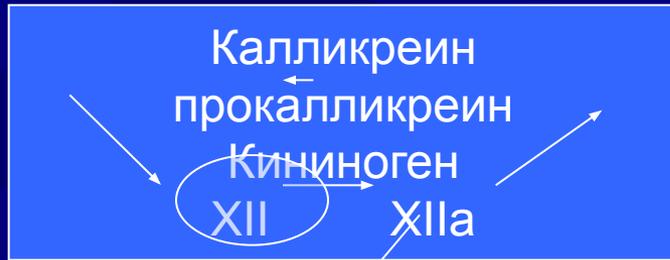
- Фактор X, активированный на поверхности фосфолипидов комплексом IXa-VIIIa или комплексом фактор VIII-ТФ, образует комплекс с фактором V и протромбином. В результате последовательного расщепления двух связей в молекуле протромбина (Arg320-Ile321) образуется мейзотромбин, состоящий из двух половин молекулы, 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  $\alpha$ -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: прокоагулянтная антикоагулянтная, вазоактивная и митогенная. 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 (7TM), от которого отщепляется N-концевой пептид, который и активирует рецептор. В этом случае одна молекула может активировать несколько рецепторов.
- В двух ключевых реакция 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 расщеплении в этих факторов 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



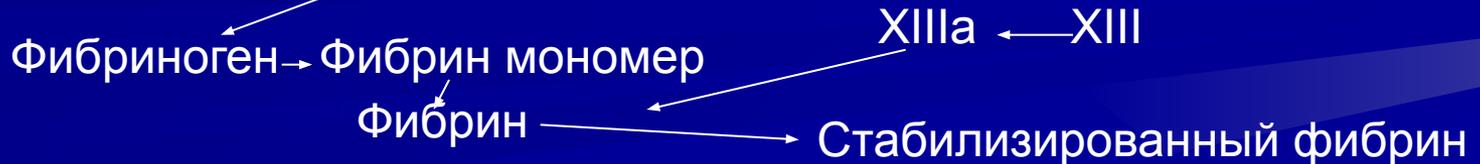
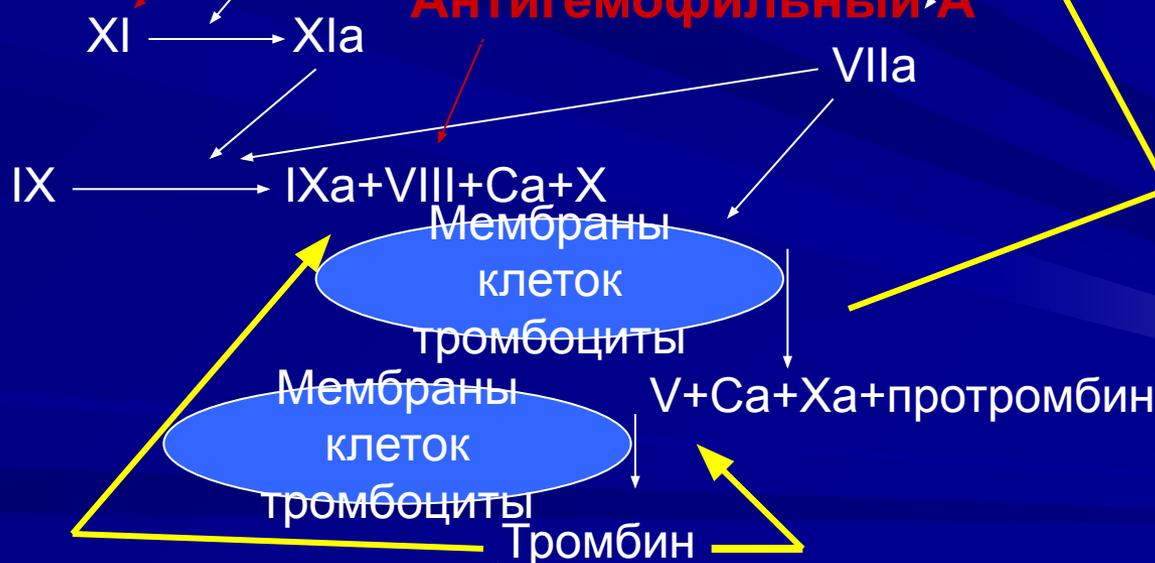
## Внешний путь



Появляется при повреждении ткани

**Антигемофильный В**

**Антигемофильный А**



# 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, снижает поверхностный уровень прокоагулянтных фосфолипидов.

# Система противосвертывания:

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

# Серпины

- Серпины (включая овальбумин, ангиотензиноген, тироксин-связывающий белок) состоят из около 400 аминокислот, различия в м. м. обусловлены гликозилированием. Участок взаимодействия с протеазами находится в С-концевой части, N-концевая часто 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 активным центром. Комплекс выводится из кровотока и разрушается.

# Антитромбин III

- Антитромбин III ингибирует все протезы системы свертывания, а также плазмин, трипсин и C1s компонент системы комплемента.
- Состоит из 442 аминокислот, 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 – 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, Lys 133. За счет связывания с гепарином увеличивается константа скорости ингибирования: от  $1 \text{ Mc}^{-1}$  до  $10(7) \text{ mc}^{-1}$ .
- В кровеносных сосудах функцию гепарина могут осуществлять глюкозаминогликаны и гликопротеины поверхности эндотелия

# Гепарин

Глюкозаминоглика

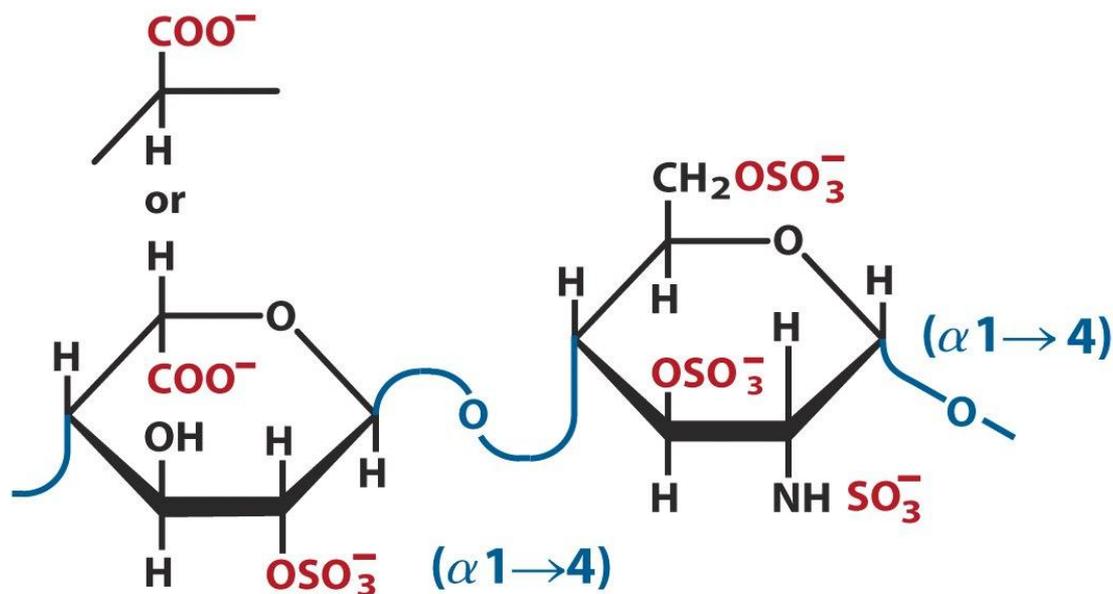
Н

Число  
дисахаридов  
на цепь

Повторяющиеся дисахари

Гепарин

15-90



GlcA2S or IdoA2S

GlcNS3S6S

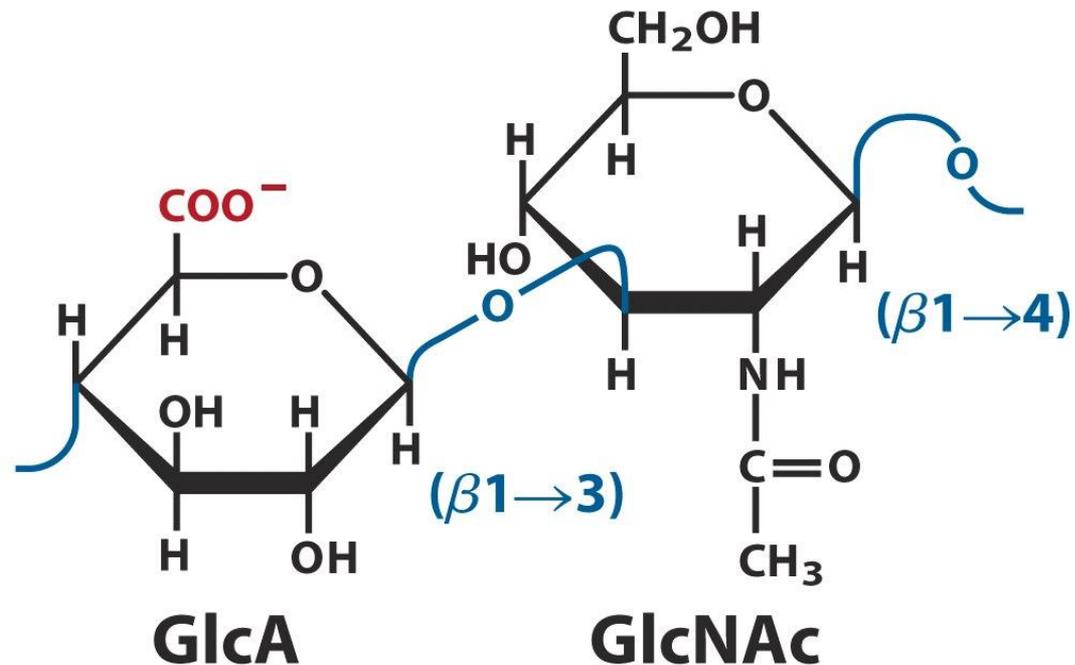
# Гиалуроновая кислота

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 увеличивают риск тромбоза.
- Тип 1 дефицита – снижена активность и концентрация антитромбина III
- Тип II – концентрация в пределах нормы, но изменены свойства: мутация Pro429-Leu (Ia) – 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 домен, гомологичный лектинам, за ним 6 EGF-доменов, участки гликозилирования и TM домен. Связывает тромбин с высоким сродством (EGF 5 и 6) и углеводной цепью.
- Связывание тромбина с TM увеличивает эффективность реакции активации ПрС примерно в 20000 раз и ингибирует прокоагулянтные свойства тромбина: активацию тромбоцитов, фактора V. Стимулирует разрушение тромбина лизосомальными ферментами.

# Протеин S

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

# Дефицит протеина C 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 с дефицитом антитромбина III.
- Частота 1 на 300 человек.

# Резистентность к протромбину С и тромбозы

- Резистентность к прС 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.

# 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 (EGF, крингл и каталитический домен).
- Культура гемолитического стрептококка производит стрептокиназу, образующую комплекс с плазминогеном, в результате чего формируется активный центр протеазы.

# 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)  |

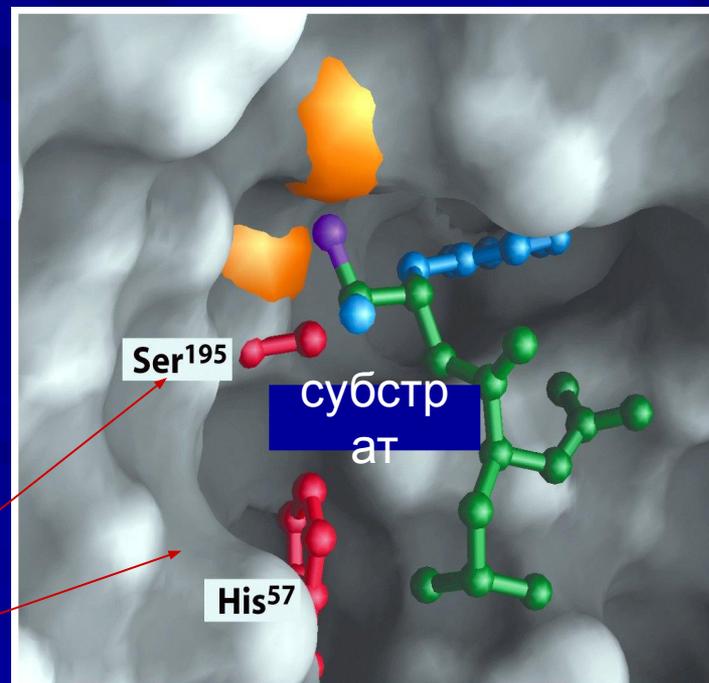
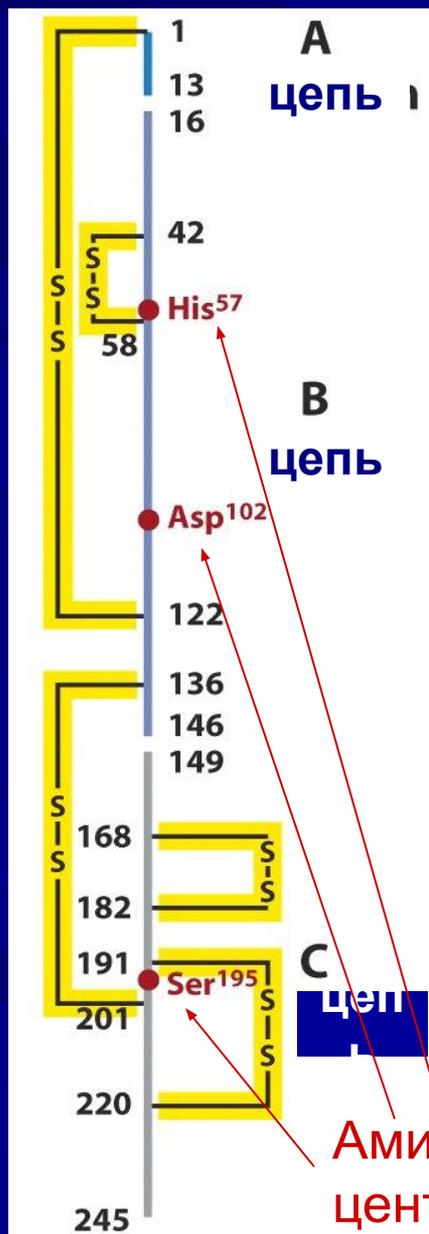
# Механизм действия химотрипсина (приложение)

*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*.

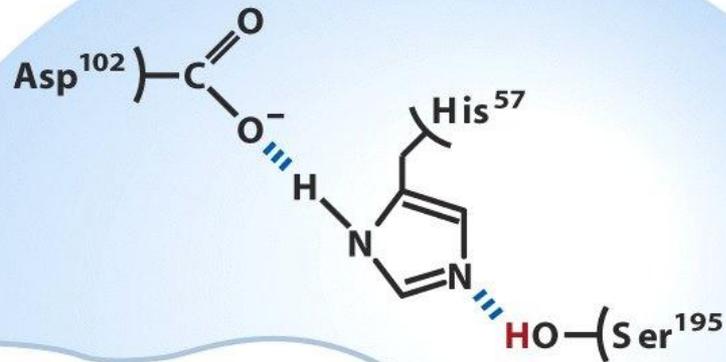
Каталитический цикл состоит из двух фаз, в первой из которых разрывается пептидная связь субстрата и образуется эфирная связь между

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

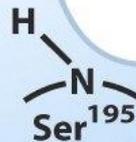
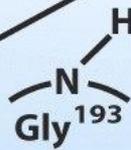


# Активный центр и субстрат ХИМОТРИПСИНА

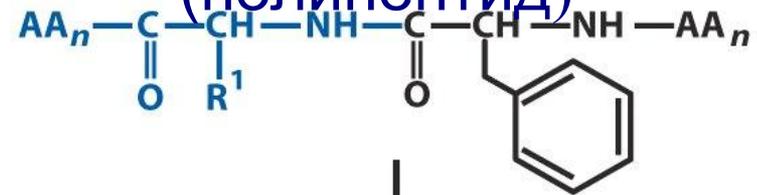


Гидрофобный карман

**Активный центр**  
карман для оксианиона

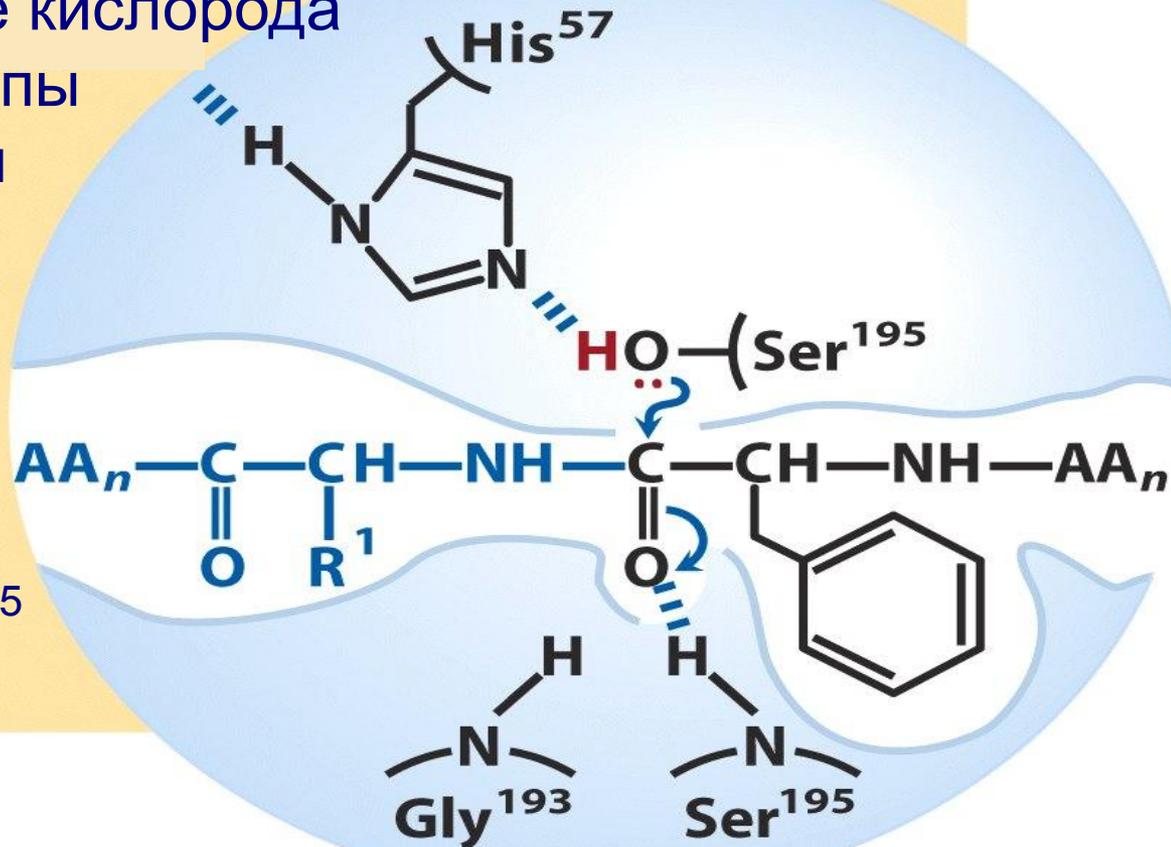


Субстрат  
(полипептид)



# 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>

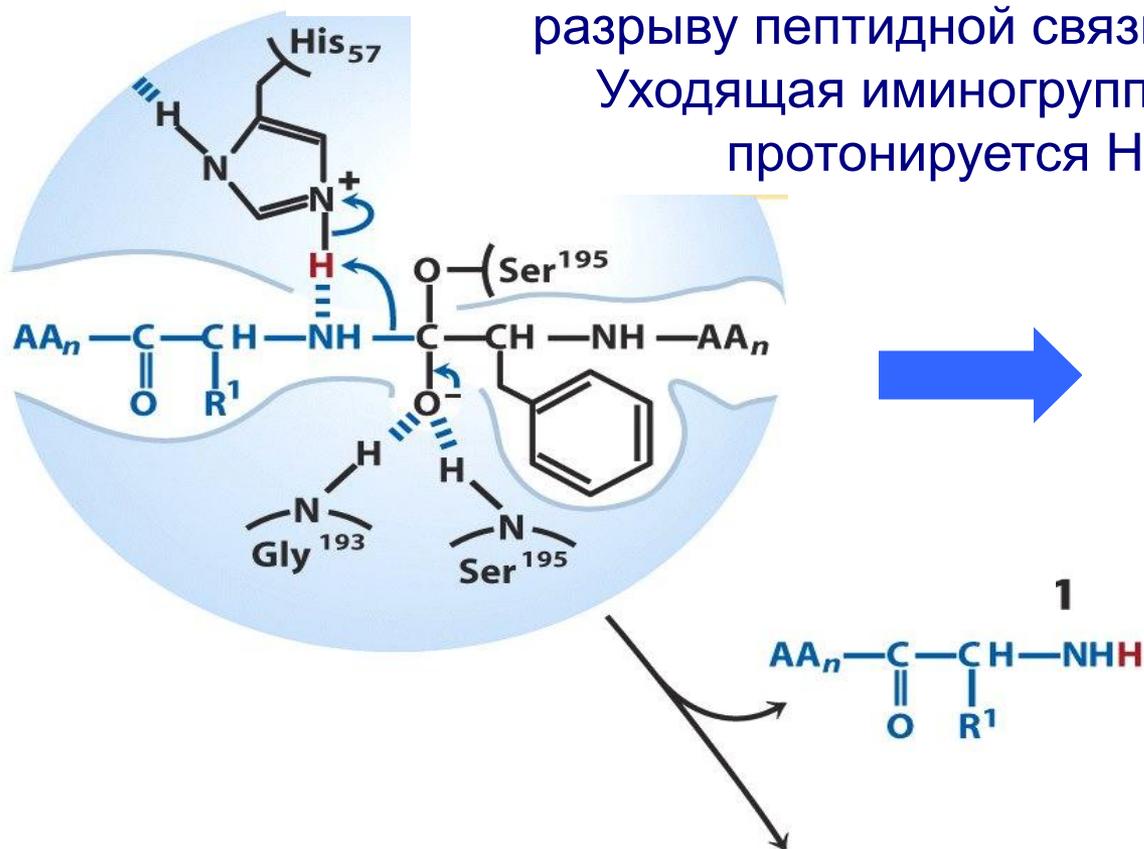


**ES** комплекс

# 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>

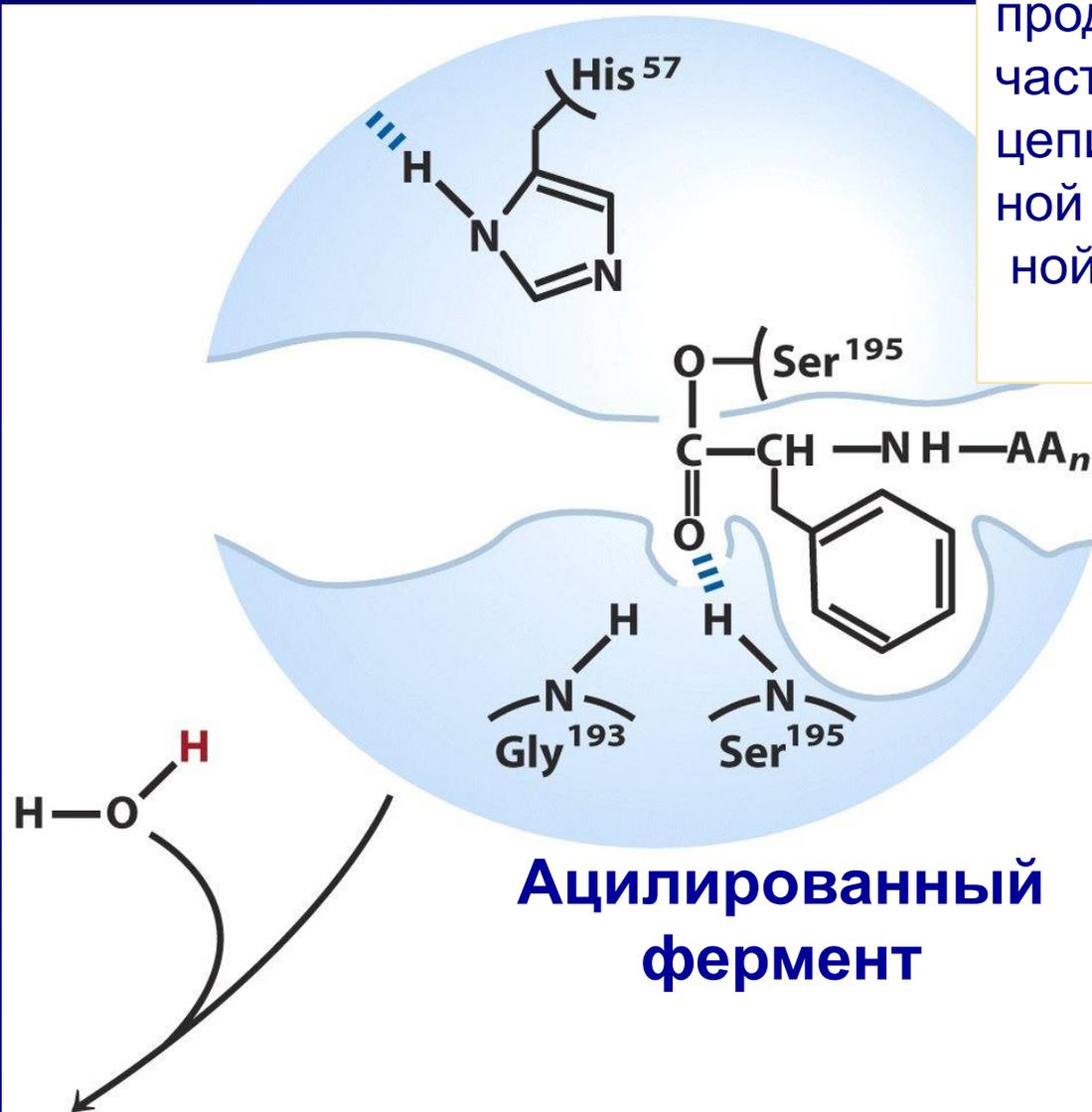


См. следующий слайд

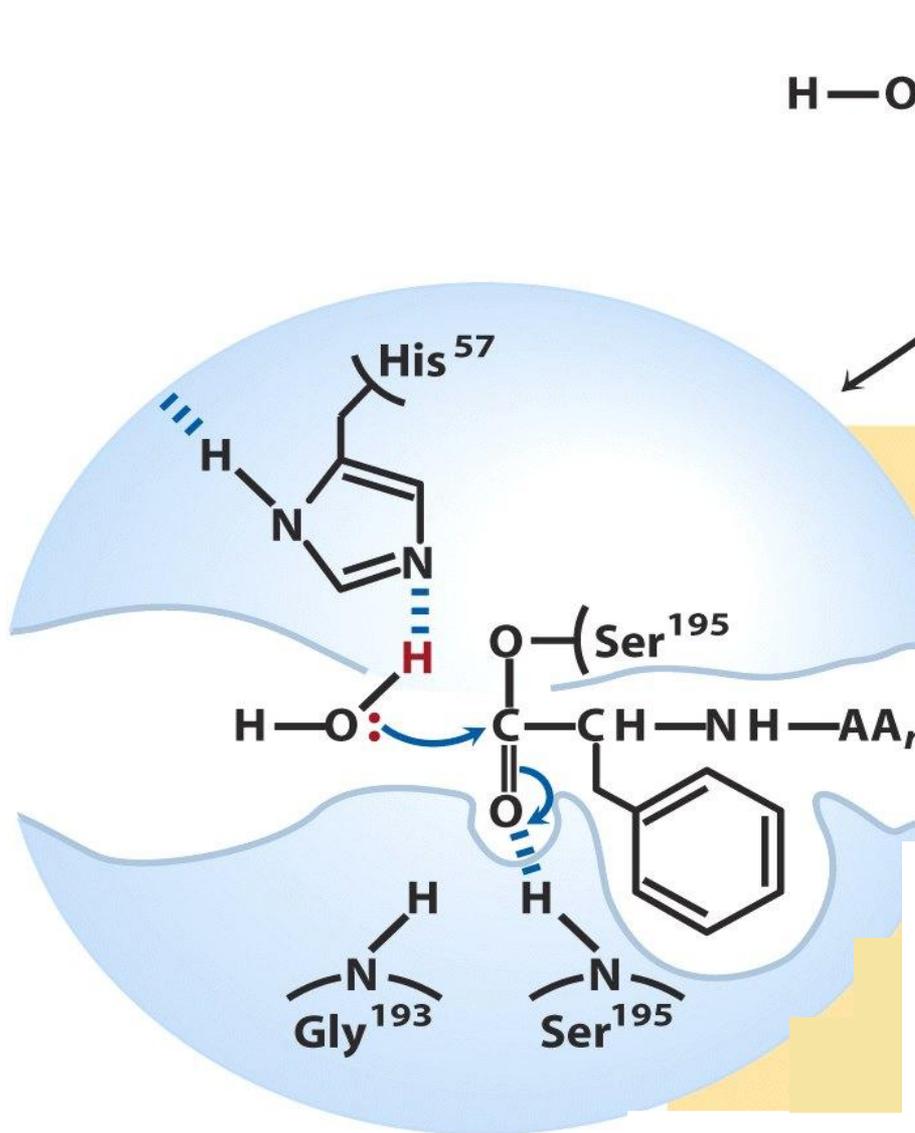
Продукт 1

# Стадия 3: образование ацилфермента

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

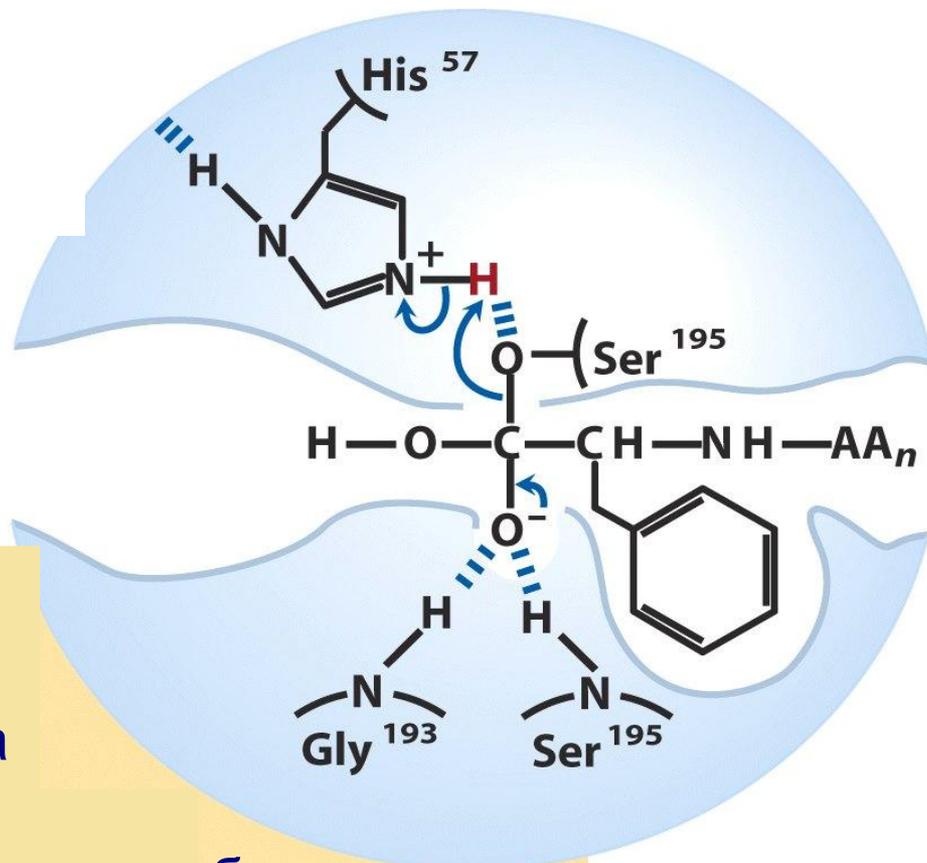


# Стадия 4: связывание воды



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

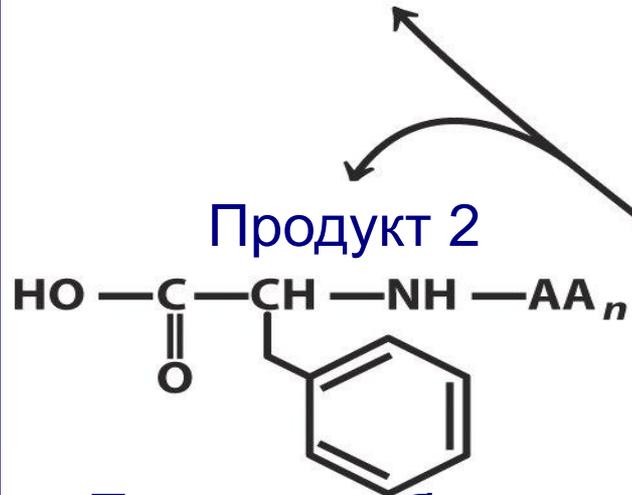


При распаде второго интермедиата образуется

продукт, карбогидрат-анион, и H от His<sup>57</sup> перемещается к Ser<sup>195</sup>.

# Стадия 6: образование комплекса фермент-продукт и освобождение

## Комплекс фермент-продукт



После освобождения второго продукта происходит регенерация свободного фермента

