

ENZIMELE PLASMATICE

Din cele 2000 enzime atestate pînă în prezent, numai o mică parte se localizează în plasmă (sau ser) și sunt depistate în mod clinic *prin intermediul* diagnosticului, pronosticului, stabilirii evoluției proceselor cronice și, în consecință, orientarea terapeutică. Din cele 6 clase deocamdată sunt mai puțin interesante pentru practica medicală curentă izomerazele și ligazele, dar și acestea valorează pentru investigațiile de patogenie la nivel molecular.

Enzimele plasmatică sunt de proveniență celulară, fiind difuzate din țesuturi în sînge. Mecanismul disenzimiei plasmatică, mecanism de traversare a enzimelor și izoenzimelor tisulare în ser, este foarte complex, posibil fiind o rezultată a interacțiunii mai multor factori, dintre care principalii sunt:

- amplificarea biosintezei enzimei determinată la nivelul controlului genetic, în transcripție sau translație;
- majorarea numărului de celule capabile de sinteză intensivă;
- gradul de alterare a proceselor energetice și, consecutiv, al permeabilității selective a membranelor;
- vascularizarea organului lezat;
- schimbarea profilului enzimatic al organului în dependență de boală.

Dacă demarează eliberarea enzimelor, apoi viteza de producere a lor în lichidul extracelular va depinde de :

- localizarea ultrastructurală diferită a enzimelor: cele citoplasmice fiind mai ușor antrenate în circulație decît desmoenzimele legate de membranele organelor, ele se vor afirma la progresarea procesului patologic, la lezarea celulei;
- greutatea moleculară a enzimelor, dimensiunile moleculelor: cele mici difundează cu viteză mai mare decît celelalte și se eliberează la etapele timpurii ale alterării; viteza lor de eliberare e invers proporțională cu masa moleculară;
- gradientul de concentrație în membrana celulară ce determină forța motrice a eliberării de enzime. De exemplu, în celulele ficatului concentrația LDH e de 3000 ori mai mare decît nivelul enzimei extracelular; în eritrocite – numai de 200 ori; sorbitol DH = 50.000:1; alcool DH = 20.000:1; ASAT și ALAT = 10.000:1; enzimele cu un gradient de concentrație mare abandonează mai ușor celulele decît cele cu coeficient mai mic;
- timpul de înjumătățire diferit al enzimelor plasmatică: LDH = 113 ore; ASAT = 17 ore și ALAT = 47 ore;
- inactivarea neproporțională;
- eliminarea diferită destul de redusă prin bilă (fosfataza alcalină, 5'-nucleotidaza, ceruloplasmina) și urină (cu masa moleculară mai mică decît 60.000 Da);
- suprapunerea modelelor enzimatică caracteristice diferitelor organe.

Clasificarea funcțională a enzimelor plasmatică

Enzimele din plasmă se clasează, din punct de vedere al provenienței și funcției, în următoarele categorii:

1) *enzime secretorii* cu rol activ în plasmă, produse în ficat. Aici se includ enzimele coagulării, lecitin-colesteraza, renina, ceruloplasmina, pseudocholinesteraza; nivelul lor scade o dată cu lezarea celulelor producătoare.

2) *enzime excreto-secretorii* provenite din glandele exocrine și pancreas. Ele sunt excretate și acționează la nivelul tubului digestiv (amilaza, lipaza, tripsina), se elimină prin bilă – leucin aminopeptidaza, fosfataza alcalină – la lezarea celulelor de origine sau la prezența unui obstacol la nivelul căilor excretorii. De asemenea, vor fi prezente în sânge și la sporirea permeabilității membranei celulelor secretorii.

3) *enzimele indicatorii celulare* predomină în plasmă, la lezarea celulei de origine. Ele au valoare de indicatori plasmatici ai sediului organului lezat intrastructural.

Localizarea leziunii nu e întâmplătoare și poate fi stabilită prin următoarele modalități:

- a) dozarea unei enzime specifice de organ;
- b) determinarea și caracterizarea izoenzimelor cu valoare organospecifică;
- c) stabilizarea activității unor grupări (constelații) de enzime.

Lezarea principalelor organe ar trebui să se reflecte în plasmă. Reflectarea plasmatică a profilului de organ nu se observă totuși în mod constant, deoarece se produce fenomenul de dispersie a profilului datorat complexității și disproporției de contribuție a factorilor menționați. Dispersia enzimatică este mult mai puțin pronunțată după o afecțiune unică și gravă (infarct miocardic vast), fapt care justifică utilitatea testelor, în special, în cazul acutizării maladiei. Agresiunile slabe și repetate favorizează fenomenul de dispersie, și indicii activității enzimaticice nu mai corespund celor din celulele de origine.

Principalele enzime plasmaticice cu valoare diagnostică

Ficat. Enzimele organospecifice sunt: histidaza, urocanaza, ceto-1- α -fosfat-aldolaza, sorbitol dehidrogenaza, ornitincarbamil-transferaza, arginaza.

Glutamat dehidrogenaza – enzimă mai puțin specifică – este caracteristică mitocondriilor hepatice, manifestată printr-un grad de activitate mai redus în miocard și rinichi. E un indicator al afecțiunii mitocondriilor celulelor.

GOT-ASAT (aspartat aminotransferaza) reprezintă o enzimă biloculară (citozol și mitocondrii), prezentă în toate celulele organelor și, în special, în miocard, ficat, mușchi, rinichi.

GPT-ALAT (alanin aminotransferaza) se conține în cantități mari în citoplasma hepatocitelor, se utilizează în diagnosticul precoce al formelor anicterice și în depistarea perioadelor de evoluție a hepatitelor cronice.

Lactat DH e prezentă în toate celulele organismului, constituind un tetramer alcătuit din două subunități peptidice – H și M – asociate în cele 5 izoenzime proprii tuturor țesuturilor.

Sporirea esențială de LDH₁ și LDH₂, cu prevalarea lui LDH₁, este caracteristică infarctului miocardic, iar respectiv a LDH₂ – anemiei megaloblastice. LDH₅ se depistează preponderent în necroza hepatică.

Testiculul postpubertin conține o enzimă organospecifică LDH_z, cu o mobilitate electroforetică între LDH₃ și LDH₄.

Valorile *raportului Schmidt* (ASAT + ALAT/GDH) oferă date importante referitoare la pronosticul unei hepatopatii evolutive.

Leucin aminopeptidaza provine, preponderent, din celulele parenchimului hepatic, fiind caracteristică și altor organe – pancreasului, rinichilor, intestinului, mucoasei.

Devierile patologice semnificative pentru diagnosticul diferențiat sunt extensiunile semnalate în icterele obstructive cauzate de obstacolul biliar.

Izocitrat dehidrogenaza totală sporește în cazul sindromului de citoliză hepatică.

Icterul obstructiv se caracterizează prin creșterea *5'-nucleotidazei*, la fel prin intensificarea *fosfatazei alcaline*, care, la rândul ei, sporește selectiv în afecțiunile osoase, cu orientare osteoblastică.

Miocard. Caracteristicile specifice în cazul afecțiunilor acestui țesut sunt: β -hidroxibutiratdehidrogenaza, LDH totală și, mai esențial, LDH₁ și LDH₂, cu predominarea primei izoenzime; ASAT – ca izoenzimă mitocondrială.

Creatinkinaza - CPK. Se află în trei forme izoenzimatică, localizată în citoplasmă și mitocondriile din miocard, mușchi și creier. Enzimele catalizează formarea de ATP din creatinfosfat și ADP în țesuturile menționate în următoarele forme: MM – în musculatura scheletică și miocard; BB – în creier, musculatura scheletică; MB – în miocard. Enzima serică se inactivează rapid prin oxidarea grupărilor SH ale situsului său catalitic.

La infarctul miocardic, o dată cu extinderea necrozei, proporțional crește valoarea CPK/MB. La miopatii se semnalează creșterea CPK, fără modificări ale activității izoenzimei MB.

Pentru infarctul miocardic acut sunt caracteristice valorile majorate ale *3-glicer aldehidfosfat dehidrogenazei, fosforilazei b.*

Creier. În afecțiunile lui se înregistrează valori semnificative ale activității *CPK totale și izoenzimei BB, acetilcholin esterazei, monoaminoxidazei*, valori majore ale *ASAT*, cu mult superioare celor din cadrul afecțiunilor altor organe.

Rinichi. Patologia lor este precedată de valori semnificative în activitatea *glicinamidino transferazei*, pe când în patologia pancreasului – în cantități mai mici.

Pentru diagnostic se utilizează frecvent și *izoenzimele alanin aminopeptidazei* cu următoarea caracteristică: AAP₁ (în ficat), AAP₂ (în pancreas) și AAP₃ (în rinichi). O semnificație aparte pentru diagnosticul afecțiunilor renale are *glutaminaza*.

Mușchii scheletici. Patologia lor e caracteristică prin sporirea *CPK totală*, a *izoenzimei MM*; de asemenea, prin activizarea *F-1, 6-difosfat-aldolazei* și devierea modelului *izo-LDH₅ către LDH₁*.

Fosfataza alcalină este o enzimă compusă din trei forme izoenzimatică: hepatobiliară, osoasă și intestinală. În decursul sarcinii se mai adaugă o formă tranzitorie-placentară. Mobilitatea electroforetică diferă de forma moleculară. Ordinea descrescândă a acestei valori de la anod către catod este următoarea: hepatică, osoasă, intestinală. Aceste izoforme se reglează diferit: fosfataza intestinală este inhibată de L-fenilalanină, L-tirozină, L-triptofan; cea placentară – numai de L-Phe.

Un interes deosebit prezintă *fosfataza acidă*, care se află în organe conform ordinii descrescătoare a valorii: prostată, oase, ficat etc. Amplificarea activității fosfatazei acide și, mai ales, a izoenzimei sale tartrico-sensibile, e înregistrată la carcinomul metastazat al prostatei.

Dintre izoenzime se mai utilizează frecvent și cele ale *α -amilazei*, având două izoenzime: forma *salivară și pancreatică*; ele se majorează respectiv la parotidite și la pancreatite acute. La cea din urmă patologie crește și lipaza pancreatică.

Poate fi explorată și pseudocholin esteraza, care sporește la afecțiunile hepatice cronice evolutive, în special în ciroză, și scade în intoxicații cu fosfor organic.

SISTEMELE TAMPON SANGUINE

În organismul uman reacția mediului intern abia depășește cadrul neutru: pH=7,35-7,45. Păstrarea acestei constante este hotărâtoare pentru desfășurarea normală a tuturor proceselor vitale. Menținerea pH-ului în limitele date o realizează următoarele mecanisme funcționale:

- 1) eliminarea renală a acizilor și bazelor;
- 2) eliminarea pulmonară a dioxidului de carbon;
- 3) neutralizarea acizilor și bazelor de către sistemele tampon.

Un sistem tampon constă din amestecul a două substanțe tampon cu acțiuni complementare: una din ele se opune scăderii pH-ului determinată de acțiunea unui acid (la adaosul lui), iar cealaltă se opune creșterii lui determinată de adaosul unei baze. Aceste două substanțe din constituția unui sistem tampon pot fi: un acid slab și sarea sa alcalină sau o bază slabă și sarea sa acidă. Indiferent de natura chimică, componenta sistemului tampon care neutralizează acizii se numește *componentă bazică*, iar cea care neutralizează bazele este *componentă acidă*.

Cele mai importante sisteme tampon care funcționează permanent în organismul uman sunt cele ale acidului carbonic - bicarbonat; al fosfaților, al proteinelor și hemoglobinei.

I. Sistemul tampon acid carbonic-bicarbonat Cota lui e de 10% din total, constituind unul din sistemele ce se reglează fin. H_2CO_3 joacă rolul de donator de protoni, iar ionul bicarbonat HCO_3^- – de acceptor al protonului:



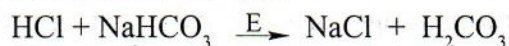
Bicarbonații din lichidul extracelular se prezintă sub forma de sare de Na - $NaHCO_3$, iar în celulă – $KHCO_3$, avînd anionul comun HCO_3^- .

Ecuatia Henderson - Hasselbach:

$$pH = pK_{H_2CO_3} + \lg \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

pK - constanta disociației egală cu 6,1
 $[HCO_3^-]$ - concentrația ionilor
 $[H_2CO_3]$ - concentrația moleculelor nedisociate

În activitatea metabolică majoritatea acizilor formați sunt mai tari decît acidul carbonic. Pentru neutralizarea lor intervine componenta bazică a sistemului $NaHCO_3$ și are loc reacția de tipul:



Anhidraza carbonică scindează acidul în $H_2O + CO_2$, la care dioxidul de carbon se elimină prin plămîni.

O bază tare generată, neutralizată fiind de componenta acidă a sistemului H_2CO_3 , se va transforma în bicarbonat:



CO₂ sub formă de H₂CO₃ este permanent disponibil pentru tamponarea bazelor și CO₂ reprezintă un produs încontinuu, constituind ultimul metabolit al majorității substanțelor transformate în organism.

În mod normal, la pH = 7,4 în plasmă și în lichidul extracelular raportul bicarbonat acid este de 20/1. Funcționarea acestui sistem tampon se combină cu cea a sistemului hemoglobinei.

La o *hipoventilație* pulmonară are loc scăderea difuziei CO₂ din sânge spre alveolele pulmonare, deci o mărire parțială a tensiunii acestui gaz în plasma sanguină. În ultima instanță, sporește aciditatea sîngelui. La o *hiperventilație* fenomenele decurg invers.

II. Sistemul tampon al fosfaților

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} + \lg \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

[HPO₄²⁻] - concentrația ionilor Na₂HPO₄
 [H₂PO₄⁻] - concentrația ionilor NaH₂PO₄
 pK - constanta disociației egală cu 6,87

La valoarea pH = 7,4, valoarea raportului dintre ingredientii constituie 5:1, ceea ce înseamnă că concentrația formei acide e de 5 ori mai mică, fapt ce denotă o bună capacitate de tamponare pentru cantități suplimentare de acid.

Procesul tamponării are loc potrivit reacțiilor:



Acest sistem este operant, în special, în hematii și în celulele tubulilor renali. Atare sistem de tampon are un rol deosebit în țesuturi, cota fiind de 1% din întregul sistem. Capacitatea sistemului în sânge e maximă – la pH = 7,2.

III. Sistemul tampon al proteinelor predomină în celulele țesuturilor, dar operează și în plasmă. În constituția lui intră proteinele care funcționează ca anioni la pH-ul slab alcalin al mediului intern (+). În combinație cu ionii H⁺ anionii proteici constituie componenta acidă a sistemului (H-proteina) și tamponează bazele:



Anionii proteici, în combinație cu cationii metalelor alcaline (Na, K), formează componenta bazică și tamponează acizii:



Și în acest caz, datorită tamponării, acizii și bazele se transformă în produși neutri (NaCl și H₂O), iar componentele sistemului se transformă una în cealaltă, manifestînd aciditate sau bazicitate moderată, la care pH-ul mediului nu se afectează.

IV. Sistemul tampon al hemoglobinei la fel conține componentă proteică cu o capacitate mare – cota de 75% din total.

Participarea hemoglobinei în reglarea pH e însoțită de transportul O_2 și CO_2 . Constanta disociației grupelor acide ale Hb este în dependență de saturarea cu O_2 .

Hb intră în componența a 2 sisteme tampon:

a) HHb (hemoglobină acidă) - KHb (hemoglobinat de potasiu);

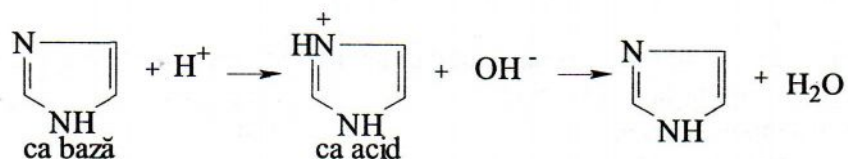
b) HHbO₂ (oxihem. acidă) - KHbO₂ (oxihemoglobinat de potasiu).

Oxihemoglobina este un acid mai puternic ($pK = 7,16$) decât dezoxihemoglobina ($pK = 7,71$) și cedează O_2 , conform ecuației:

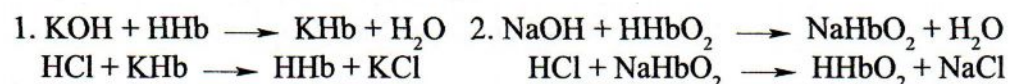


Ambele sisteme își pot exercita acțiunea tampon datorită hemoglobinei care include în partea sa proteică multe resturi de histidină.

Inelul imidazolic posedă capacitatea de a accepta și totodată de a ceda H^+ unuia dintre atomii de azot ai heterociclului.



Reacțiile respective ale acestui sistem tampon sunt:



Acidul și baza se transformă în produși neutri, păstrând aciditatea sau bazicitatea lor moderată, fără a afecta pH-ul mediului.

Anomaliile echilibrului acido-bazic sunt asoțite de apariția acidozelor și alcalozelor (metabolice și respiratorii). Deoarece, în evoluția proceselor metabolice se generează ioni de hidrogen (H^+) și nu ioni de hidroxil (OH^-), tendința spre acidoză se întâlnește mult mai frecvent decât tendința la alcaloză. Mecanismele homeostatice sunt adaptate, în special, pentru contracararea unui exces de H^+ și din acest motiv, relativ mai rar, alcalozele (metabolice) se compensează cu dificultate. E concludent, că la procesele complexe de menținere a echilibrului acido-bazic contribuie toate celulele organismului, un rol premordial revenind hematilor, plămânilor și rinichilor.

HEMOSTAZA ȘI FIBRINOLIZA

Echilibrul fluido-coagulant constituie un sistem de mecanisme antagoniste și interdependente, factor hotărâtor al conservării potențialului hemostatic al sîngelui, precum și al fluidității acestuia. Sunt procese reglate enzimatic, tulburarea și dezechilibrul cărora cauzează formarea de trombe (cheaguri) sau sîngerarea.

Coagularea

Particularitățile caracteristice acestui proces sunt:

- 1) numărul mare de activatori și inhibitori care intervin;
- 2) existența majorității factorilor coagulanți, ca precursori;
- 3) preponderent, drept factori coagulanți servesc proteazele ce se produc la proteoliza limitată din formele lor inactivate;
- 4) transformarea lor din forme inactivate în active are loc prin autocataliza determinată de propriile lor produse;
- 5) unii factori, ca de exemplu Ca^{++} , au acțiune multiplă, intervenind pe parcursul timpului de coagulare;
- 6) procesul complex decurge "în cascadă"; faza latentă este formată de avalanșa transformărilor accelerate ale factorilor coagulării prin forme inactivate și active.

În desfășurarea procesului coagulării se disting faze care, în ordinea manifestării lor succesive, se eșalonează în *doi timpi*, și anume:

a) *timpul parietal* este determinat de vasoconstricția vaselor mici, capilarelor din țesutul afectat de serotonină, catecolamine și obturarea lor prin agregate trombocitare. La interacțiunea fibrelor de colagen ale vasului lezat cu trombocite, prin forțe electrostatice, are loc agregarea lor. Trombocitele agregate suferă metamorfoză vîscoasă și, în consecință, elimină astfel de compuși ca: serotonină, catecolaminele, fosfolipidele și îndeosebi ATP, ADP, ultimul amplificînd agregarea trombocitelor și accelerînd obturarea vaselor lezate. Această agregare are un caracter reversibil.

b) *timpul plasmatic* reprezintă o agregare ireversibilă a trombocitelor asigurată de acțiunea trombinei, ce duce la formarea cheagului rezistent.

Procesul autocatalitic, la etapele inițiale, necesită cantități minime de factori și decurge în patru etape succesive: producerea protrombinazei, generarea trombinei, transformarea fibrinogenului în fibrină, cu stabilizarea acestuia, sinereza și retracția cheagului.

Ultimul timp al procesului, care se produce în homeostazia hemostazei, e fibrinoliza.

În anul 1863, Djozef Lister a observat că în vena jugulară izolată sîngele bouului rămîne lichid, pe cînd separat în vasul de sticlă – se coagulează. S-a constatat că acest contact cu obiect artificial duce la formarea unor componente proprii sîngelui. Acest mecanism de coagulare a fost numit *intrinsec*.

La adăugarea în plasma sanguină a unor componente, coagularea de asemenea are loc. Acest mecanism a fost numit *extrinsec*. La coagulare, ambele mecanisme activează concomitent. Ele se deosebesc numai la etapele inițiale.

Caracteristicile principalilor factori ai coagulării

Factorul I – fibrinogenul – prezintă o glicoproteină care se sintetizează în ficat, are aproximativ o masă moleculară egală cu 340 kDa și o formă moleculară alungită. Fibrinogenul e alcătuit din 6 lanțuri polipeptidice, grupate câte 2 (α , β , γ), cu o mobilitate electroforetică β - γ . Joncțiunea lanțurilor glucidice cu cele peptidice se realizează printr-o legătură glucozil-aminil-arginină. Oxidarea glucidelor din fibrinogen îi conferă inconsistență față de fenomenul coagulării. Transformarea în fibrină se poate realiza atât artificial, cât și fiziologic.

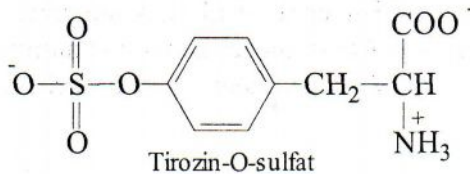
Artificial, fenomenul e provocat de acțiunea unor factori chimici ca: ninhidrina, aloxanul, cloramina; factori biologici: veninul de șarpe, stafilocagulaza, enzimele proteolitice.

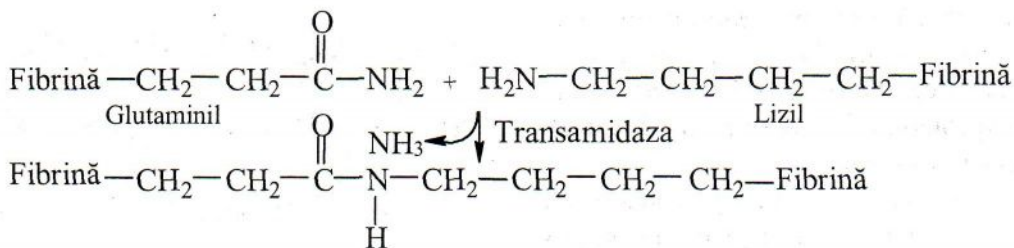
Fiziologic, în 2-3 secunde, sub acțiunea trombinei – o protează de tipul tripsinei, se scindează 4 legături peptidice între arginină și glicină, cu eliberarea a 4 peptide – 2A din α lanțuri constituite din câte 18 resturi aminoacidice și 2B din β – câte 20 fiecare, denumite *fibrinopeptide*. Lanțurile γ cu tirozina terminală nu sunt antrenate în fenomenul de conversiune a fibrinogenului în fibrină.

Cu pierderea fibrinopeptidelor, se creează condiții favorabile pentru asocierea spontană a monomerilor sub formă de polimeri intermediari, cu legături de tip necovalent, realizate prin interacțiuni hidrofobe și punți de H. Complexul este solubil, dar puțin stabil. Polimerizarea monomerilor se realizează longitudinal și transversal și duce la o gelificare, cu transformarea din stare de sol în cea de gel, rezultând un cheag amorf, slab.

La acțiunea unui factor stabilizant (F.XIII) – o fibrinază activată prin trombină, se formează o fibrină insolubilă, care conferă cheagului rigiditate; se stabilesc legături covalente peptidice între grupările α -amino din resturile de lizină și carboxil ale glutaminei (enzima e o transamidază). *Factorul de stabilizare a fibrinei* (FSF, F.XIII) este o glicoproteină tetrameră cu masa moleculară de 340 kDa, formată din câte o pereche de peptide identice, *a* (75 kDa) și *b* (80 kDa). Centrul activ e localizat în lanțurile *a*. F.XIII, se formează în hepatocite; în plasmă se găsește sub formă inactivă, într-o concentrație de 0,02 g/L. FSF inactiv se fixează pe suprafața coloanelor de fibrină și se activează pe loc prin proteoliză de către trombină, în prezența ionilor de Ca^{2+} , prin scindarea unei legături între arginină și glicină în lanțurile *a*, în urma căreia se eliberează de la porțiunea N-terminală un peptid blocant, cu masa moleculară de 4 kDa. F.XIII activat se consumă rapid astfel încât în unele cazuri de tromboze venoase extinse cantitatea lui poate să scadă considerabil. FSF acționează în două faze, în prezența ionilor de calciu. La deficiența enzimei, la bolnavi apare o hemofilie (sîngerare). Care-i cauza diferitelor solubilități ale fibrinogenului și monomerului de fibrină?

E stabilit că toate fibrino-peptidele detașate au sarcină electrică negativă (acid glutamic și aspartic, tirozin-O-sulfat), care provoacă respingerea reciprocă a moleculelor de fibrinogen. Monomerii de fibrină eliberați au o suprafață cu proprietăți electrice deosebite și capacitate de agregare.





Microscopia electronică și difracția razelor X au demonstrat că fibrina posedă o structură periodică, cu lungimea segmentului repetată de 230 Å, pe cînd lungimea fibrinogenului e de 460 Å. Monomerul fibrinei formează fascicule paralele, striate transversal, cu o periodicitate medie de 230 Å (fig.8.6, 8.7). Concentrația fibrinogenului plasmatic e între 200-400 mg% (2-4 g/L).

Factorul II - protrombina - proendo-peptidază, o glicoproteină cu mobilitatea α_2 -globulină, cu o masă moleculară aproximativ egală cu 63 kDa și punct izoelectric aproape de 5. Se sintetizează în ficat și procesul necesită

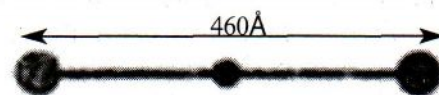


Figura 8.6. Reprezentarea schematică a moleculei de fibrinogen

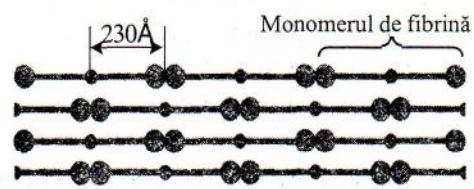


Figura 8.7. Asamblarea monomerilor de fibrină

vitamina K, favorizînd realizarea carboxilării de către un sistem de enzime dependente de vitamina K. Procesului de carboxilare îi sunt supuse primele 10 resturi de acid glutamic de la capătul N-terminal al protrombinei. Fiind transformați în γ -carboxiglutarat, aceste resturi de aminoacizi sunt capabile să fixeze ioni de Ca^{++} (fig.8.8).

Antagoniștii vitaminei K - *dicumarolul* și derivații lui, la fel ca și *varfarina* (otravă pentru șobolani), provoacă hemoragii și sunt substanțe anticoagulante. Legînd Ca^{2+} , protrombina se ancorează cu fosfolipidele membranare ale trombocitelor acumulate în regiunea afectată. Acest fragment se detașează, eliminînd *trombina*, ca rezultat al scindării proteolitice a legăturii arginină-treonină de la capatul N-terminal, apoi a legăturii arginină-leucină. Masa moleculară a trombinei e de 33,7 kDa. Trombina liberă e capabilă să activeze fibrinogenul plasmatic (fig.8.9).

Etapa de activare a F.X (*Stuart-Prower*)

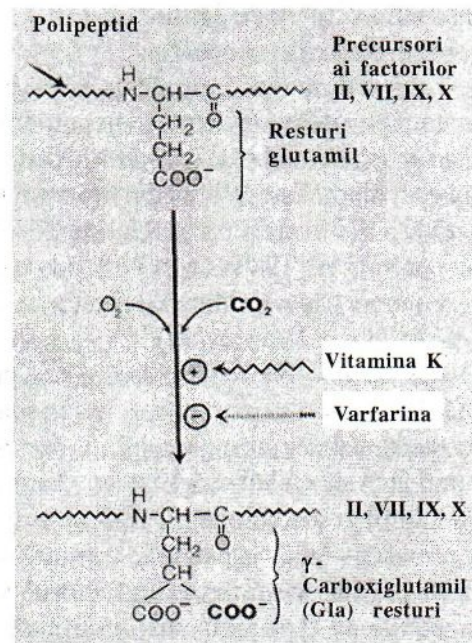


Figura 8.8. Carboxilarea resturilor glutamil

reprezintă contopirea mecanismelor de coagulare a sîngelui. Ambele mecanisme, în consecință, provoacă apariția factorilor proteolitici, ce activează F.X, cu formarea trombinei.

Factorul F.V, F.VI – proaccelerina, accelerina – este o proteină macromoleculară (350 kDa) produsă de macrofage, prezentă în cantități mici (0,01g/L) în formă inactivă în plasmă. Din cauza labilității se degradează rapid și nu mai poate fi pusă în evidență nici în ser, nici în plasma veche. Ea se consumă în decursul coagulării. Nu are proprietăți enzimatiche, dar este un component al sistemului de activare a protrombinei. Lipsa congenitală rară a F.V se transmite autozomal recesiv.

Factorul VII – proconvertina – e o globulină cu masa moleculară 15-25 kDa, are o concentrație de 10-15 mg/L, se sintetizează în ficat, cu participarea vitaminei K.

Factorul VIII – globulina antihemolitică, GAH – este o β -macroglobulină, cu masa moleculară de 2 milioane Da, prezentă în plasmă în concentrație de 0,005 g/L și avînd timpul de înjumătățire de o jumătate de zi. Se formează în hepatocite. Este un factor labil și se consumă în decursul coagulării. Este alcătuit din trei componente distincte: F.VIII_{coag.} reprezintă cofactorul activării F.X în prezența accelerinei (F.VI); F.VIII_{agn.}, purtătorul determinantilor antigenici proprii; F.VIIIvW (von Willebrand), cofactorul manifestării funcțiilor hemostatice plachetare. Lipsa ereditară a acestui component duce la manifestarea angiohemofiliei (*maladia von Willebrand*).

Factorul X (Stuart-Prower) este o proteină cu masă moleculară relativ redusă (56 kDa) produsă în ficat și prezentă în plasmă într-o concentrație de 1,003 g/L. Este o substanță stabilă care nu se consumă în cursul coagulării, formată din două lanțuri peptidice (unul greu și celălalt ușor) cuplate disulfidic între ele. F.IXa eliberează, prin proteoliză, din lanțul greu al moleculei F.X un fragment peptidic mic. Prin aceasta se descoperă centrul activ situat în partea C-terminală a moleculei, prin care enzima devine și ea activă (F.Xa). Este de remarcă că factorul Stuart-Prower poate fi activat nu numai prin mecanismul fiziologic sus - nominalizat ci, în condiții patologice, și de către alte serinproteaze eliberate și activate în cursul diferitelor reacții inflamatorii.

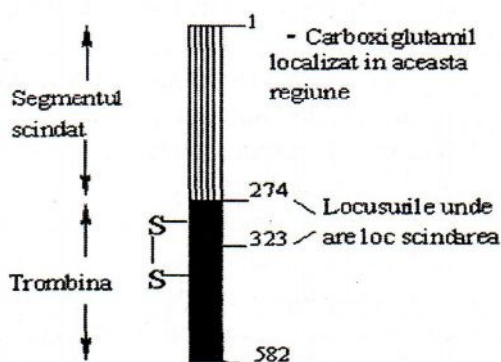
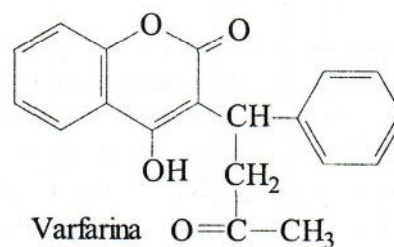


Figura 8.9. Structura protrombinei α și β catene în trombină, unite prin legătură disulfidică

Proprietățile structurale și funcționale ale factorilor sistemului de contact

În plasma sanguină sunt prezenți doi kininogeni: *macro (HMWK)* - și *microkininogeni (LMWK)*. Sinteza lor este codificată de gena localizată în cromozomul 3. Gena respectivă conține 11 exoni și 9 din ei formează trei exoni tripleți, fiecare din ei avînd originea în paternul genei cistationinei. Exonul 10 conține o secvență comună pentru ambii kininogeni (10a) și o secvență unică C-terminală pentru HMWK (10b). Exonul 11 codifică secvența unică C-terminală a kininogenului micromolecular (LMWK).

Splaisingul alternativ al transcripției primare a genei kininogenului formează două mRNA diferite, specifice pentru fiecare formă. Kininogenii sunt glicoproteine polifuncționale, moleculele cărora sunt prezentate printr-un lanț polipeptidic, sintetizate în hepatocite, apoi glicozilate înainte de a fi secretate.

Kininogenul macromolecular (factorul Fitzgerald, HMWK). Molecula de HMWK conține 626 resturi aminoacidice cu masa moleculară de 120 kDa și pI egal cu 4,3. Concentrația plasmatică este de 65-130 $\mu\text{g/mL}$.

HMWK poate reversibil să se fixeze de trombocite, neutrofile, celule endoteliale, procesul necesitînd ioni de Zn^{2+} . Fixarea se realizează prin glicoproteine identice cu receptorii ce fixează componenta C1q a complementului. La fixarea cu celulele endoteliale se majorează viteza de eliminare a bradikininei, care stimulează generarea de NO și a prostacilinei, în consecință, cu efect antitrombotic și vasodilatator. Domeniul terminal al HMWK posedă centre de fixare a prekalicreinei și a factorului XI al coagulării.

HMWK inhibă activitatea proteinazelor cisteinice, preîntîmpină degradarea proteinelor plasmatică la lezarea țesuturilor.

Kininogenul cu masă moleculară redusă de 80 kDa (LMWK, factorul Flaujeac) reprezintă restul rămas în urma scindării proteolitice a HMWK. Are o concentrație de 0,05 g/L în plasmă și timpul de înjumătățire de 30 zile. Secvența aminoacidică a bradikininei este prezentă și în molecula de LMWK, ca urmare, acest peptid purtător de semnale poate fi eliberat și din această proteină prin proteoliză.

Prekalicreina (PKAL, factorul Fletcher) și kalicreina (KAL) plasmei sanguine.

Prekalicreina este o glicoproteină ce conține 619 aminoacizi, avînd o concentrație plasmatică de 295-580nmol (35-50 $\mu\text{g/mL}$). Se sintetizează în hepatocite și gena respectivă e compusă din 15 exoni și 14 introni, localizată în partea distală a cromozomului 4. Se activează PKAL la liza legăturii peptidice Arg 371 de formele active (α și β) ale factorului XII, cu formarea lanțurilor ușor și greu ale *kalicreinei*. Lanțul polipeptidic greu (4 domenii repetate, omoloage F.XI) participă la fixarea HMWK, F.XII și a neutrofilelor. Kalicreina formată posedă un spectru larg de funcții biologice; hidrolizînd două legături peptidice în HMWK duce la generarea bradikininei.

Factorul XII (factorul Hageman) este sintetizat de hepatocite ca o glicoproteină cu masa moleculară de 78 kDa, ce conține 596 resturi de aminoacizi și 7% glucide. mRNA respectivă are o lungime de 2,8 kilobaze. Activarea are loc sub acțiunea kalicreinei amplificată de prezența HMWK. Consecutiv, se formează două forme active α și β legate prin legătură disulfidică. Lanțul greu e responsabil de fixarea proteinei de suprafața anionică, la activarea prin contact. Forma ușoară (β) este un activator efectiv al PKAL, iar α F.XIIa – al F.XI.

Factorul XI (PTA, factorul Rosenthal) este sintetizat în ficat, conține 5% glucide, are o masă moleculară de 143 kDa și este secretat în plasmă în formă de zimogen în concentrație de 30 nmol. Circulă acest factor în complex cu HMWK. Factorul PTA este o proteină serică deosebită – molecula conține lanțuri polipeptidice identice fixate prin legături disulfidice și două centre active la un mol de enzimă. Activarea factorului XI are loc sub influența factorului XIIa, în prezența HMWK.

Proteinele sistemului de contact nu sunt elemente fundamentale ale procesului de hemostază, dar joacă un rol auxiliar în generarea trombinei.

Mecanismul coagulării. *Calea extrinsecă* e de durată scurtă – de secunde. Factorul de declanșare îl constituie suc celular eliminat la lezarea țesutului – factor tisular de natură lipoproteică - fosfolipid (tromboplastină tisulară). *Calea intrinsecă* e de durată ceva mai lungă – de minute, intervenind mai mulți factori sanguini.

Căile extrinsecă și intrinsecă sunt determinate de sursa de fosfolipide. Ambele căi se finalizează cu formarea tromboplastinei active (f. Xa), ca rezultat al metamorfozei vâscoase a plachetelor și eliberarea factorilor plachetari. Procesul se realizează în 2 faze – prima reversibilă, iar cea de-a II-a este ireversibilă.

În decursul *primei faze* a activării plachetare se eliberează conținutul granulelor dense. Procesul este reversibil în sensul că în lipsa unei amplificări poate să se stingă. În mecanismul intrinsec cei mai puternici activatori ai metamorfozei vâscoase sunt tromboxanii, grație activării primare a fosfolipazei A. În cel extrinsec are loc activarea receptorilor membranari fie printr-un contact cu fibrele de colagen, fie cu mediatorii de tipul: catecolaminelor, endotoxinelor, ADP, proteazelor. Transmiterea intracelulară a semnalului recepționat are loc prin intermediul mesagerilor secunzi, ca AMPc, DAG, IP₃, NO sau prin intermediul proteinkinazelor (fig.8.10).

Faza a doua a activării este caracterizată prin eliminarea conținutului de Ca⁺⁺ al granulelor și în prezența adevizinelor (fibrinogen, fibrinectină) plachetele prezentând metamorfoza vâscoasă, aderă între ele cu formarea *cheagului alb* – o stopare a leziunii microvasculare. Serotonina eliberată din plachetele agregate, prin efectele ei vasoconstrictoare, reduce fluxul sanguin spre zona lezată.

Mecanismul complex al hemostazei funcționează în organism ca un tot unitar, dar din punct de vedere sistemic coagularea sîngelui se împarte în 5 faze succesive:

prefaza: formarea tromboplastinei plasmatică prin orice cale;

faza I: transformarea protrombinei în trombină activă;

faza II: transformarea fibrinogenului solubil în fibrină insolubilă – coagularea;

faza III: fibrinoliza (uneori și fibrinogenoliza);

faza IV: retracția cheagului.

Interacțiunea dintre factorii sistemului de coagulare a sîngelui se prezintă în formă de trei complexe fermento-cofactoriale ce asigură coagularea în condiții fiziologice (fig.8.11).

Primul complex – VIIa + FT (factor tisular) – inițiază activarea factorilor IX și X. Complexul nativ VII-FT este fiziologic inert și devine activ la acțiunea factorilor IXa și Xa, în cantități minime ce scindează o legătură peptidică în molecula factorului VII. Fixarea factorului VII de cofactorul (FT) favorizează activarea efectivă a substraturilor respective.

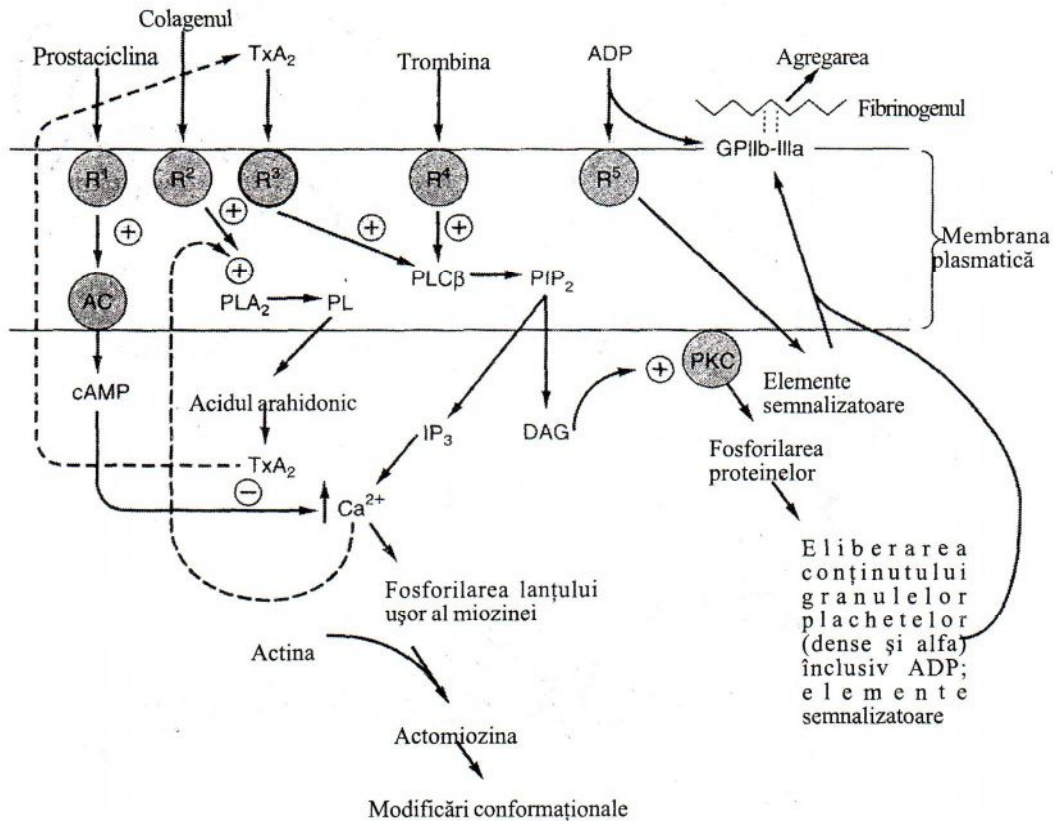


Figura 8.10. Activarea plachetelor (schematic). Mediul extern, membrana plasmatică și partea internă a unei plachete sunt reprezentate de sus în jos. Trombina și colagenul sunt cei mai importanți activatori ai plachetelor. ADP este considerat un agonist slab; el cauzează agregarea, dar nu eliberarea granulelor (GP glicoproteină, R¹-R⁵- diverși receptori, AC - adenilatciclaza, PL - fosfolipide, PLA₂ - fosfolipaza A2; PLCβ - fosfolipaza Cβ, PIP₂ - fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat, cAMP - AMPciclic, PKC - proteinkinaza C, TxA₂ - tromboxan, IP₃ - inozitol-1,4,5 - trifosfat, DAG - 1,2 diacilglicerol, proteinele G implicate nu sunt arătate).

Complexul colaborează la calea extrinsecă, fiindu-i caracteristică posibilitatea de a se inhiba numai după inițierea procesului coagulării.

Al doilea complex fermento-cofactorial (IXa - VIIIa - FL membranare) activează factorul X. Activarea factorului IXa (calea intrinsecă) este cauzată de factorul XIa - rezultat al interacțiunii factorilor participanți la activarea prin contact (XII, prekalicreina, kalicreina, kininogenul cu masă moleculară mare).

Al treilea complex fermento-cofactorial (Xa - Va - fosfolipidele membranare) transformă înfinit protrombina în trombină.

Ambele căi sunt convertite la această etapă. *Antitrombina* și *proteina C* sunt inhibitori efectivi ai complexelor 2 și 3, pînă la formarea lor. Inhibitori sunt absolut necesari în procesul reglării sistemului de coagulare a sîngelui, pe cînd deficitul lor are consecințe letale. *Antitrombina* inhibă factorii Xa și IXa. *Proteina C* activă, cu participarea *proteinei S* (cofactor), inhibă factorii Va și VIIIa activați de trombină.

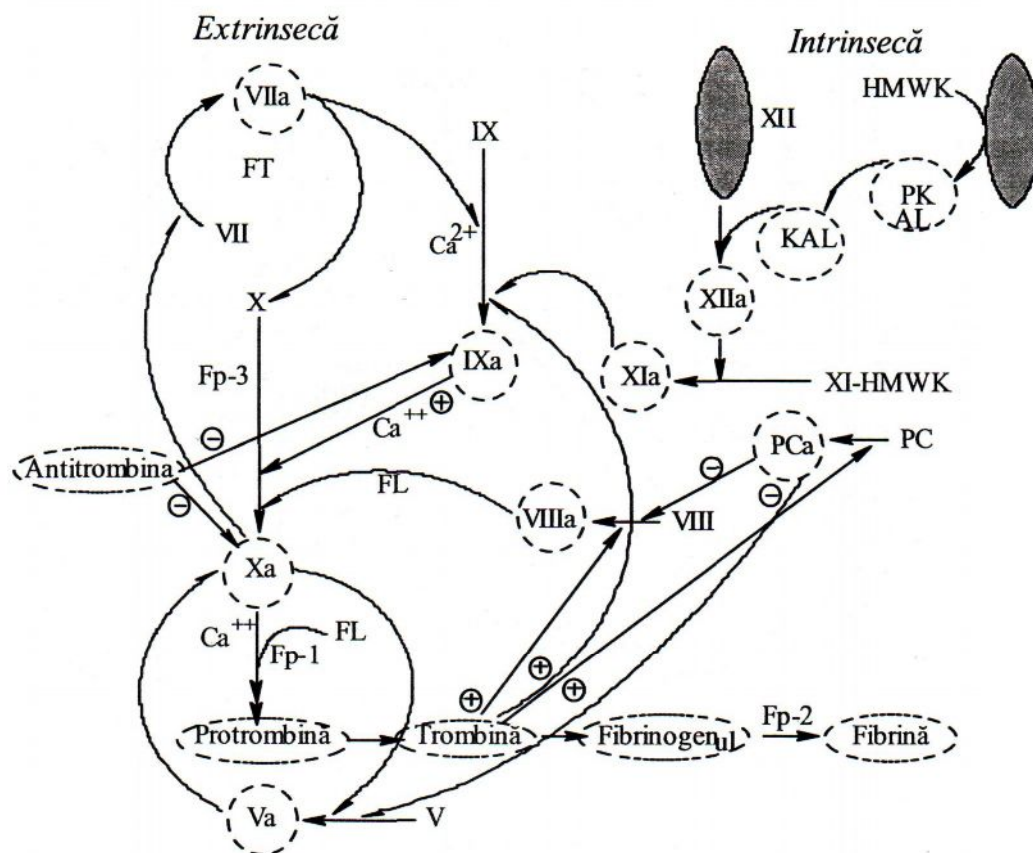


Figura 8.11. Schematic, e redat procesul de coagulare a sîngelui

Ce reprezintă factorul IX (Christmas-Eve factor)?

O catenă glicoproteică cu masa moleculară egală cu 58,7 kDa și conținând 17% de glucide. E vădită omologia dintre consecutivitatea aminoacidică la capetele N ale factorilor IX, II, X la om. Concentrația în plasmă constituie 3 mg/L. Azi e bine cunoscută și structura dimerică a F.IX. El, ca și factorii II, VII, X, proteinele C și S, formează grupa proteinelor dependente de vitamina K. Capătul N terminal, numit Gla-domen, conține resturi de γ -carboxiglutamat. Proteina se sintetizează în ficat și pînă la secreție este modificată posttranzlațional – are loc β -hidroxilarea Asp, de rînd cu cele 12- γ -carboxilări ale acidului glutamic, glicozilarea în ambele domenii (N și C terminale).

Atașarea ionilor de Ca^{2+} la domeniul Gla modifică conformația factorului, devenind biologic activ. Alte locusuri sunt necesare pentru interacțiunea cu suprafețele celulare. Domeniul C terminal conține o triadă de aminoacizi ai centrului activ, interacționînd cu F.VIII.

Sunt studiate mecanismele de activare a F.IX de către F.XIa la nivel molecular: primar, se scindează legătura peptidică Arg-Ala interioară, cu formarea unui produs intermediar neactiv cu aceeași masă moleculară. La faza următoare are loc scindarea legăturii Arg-Val, cu eliminarea unui peptid compus din 35 aminoacizi, cu masa moleculară egală cu

9000 Da de la catena grea, acesta conținând 50% de glucide ale moleculei primare, cu formarea factorului IXa. El conține o catenă ușoară (1-145 aminoacizi cu masa moleculară de 16600 Da), legată prin leg. disulfidică cu catena grea (145-415 aminoacizi și o masă moleculară egală cu 27000 Da). Caracteristică este necesitatea de ioni de Ca^{2+} , care sunt fixați numai de către F.XI. Factorul IXa rămâne fixat de centrul activ al F.XIa, ce preîntâmpină activarea ulterioară. Fosfolipidele (FL) concurează cu F.XIa pentru F.IXa, ambele posedând capacitatea de a lega fosfolipide. Astfel de mecanism previne formarea și eliberarea cantităților considerabile de F.IXa, pînă la aplicarea necesității de activare continuă a sistemului coagulant.

Capacitatea ferment-cofactorului complexului VII-FT de a activa F.IX s-a constatat recent, ceea ce explică atât deficitul F.XIa, cît și al celor ce îl activează (activarea prin contact), de a nu dereglă procesul de coagulare. Mecanismul activării exercitat de către complexul fermentativ este similar cu al F.XIa și necesită ioni de Ca^{2+} .

Investigațiile au confirmat că FT (al lipidelor) în diverse concentrații reglează activitatea F.IX și X în mod diferit. Preponderent, acest complex (VIIa-FT) activează substratul IX, dar nu și X. În calea extrinsecă a coagulării, la formarea formei intermediare a F.IX, activarea e realizată de componenta Xa-FT- Ca^{2+} , care se produce accelerat și numai faza finală de formare a IXa e determinată de complexul VIIa-FT- Ca^{2+} .

Procesul este cooperativ. Apoi IXa, în complex cu VIIIa, FL, Ca^{2+} , activează factorul X – reacția de bază în activarea F.X. Are loc scindarea legăturii Arg-Ile (45-51) la capătul N-terminal în catena grea, eliminîndu-se un peptid cu masa moleculară de 10500 Da. Procesul se produce în prezența ionilor de $Ca^{2+} + FL + VIIIa$ (cofactor).

Antitrombina și heparina favorizează inactivarea (inhibiția) F.IXa. Insuficiența ereditară a F.IX provoacă *maladia Christmas (hemofilia B)*, care apare la concentrația de 25% din normă. Există și molecule defecte, apărute la insuficiența ficatului, unde se sintetizează acest factor. Procesul de activare a F.X necesită și factorul plachetar 3 – un fosfolipid.

Sunt atestați 9 factori plachetari:

Fp1 - participă la conversia protrombinei în trombină;

Fp2 - conversia fibrinogenului în fibrină;

Fp3 - fosfolipid implicat în formarea F.X;

Fp4 - antiheparină;

Fp5 - serotonină;

Fp6 - fibrinogen plachetar;

Fp7 - trombostenină;

Fp8 - antifibrinolizină;

Fp9 - factor stabilizant al fibrinei.

Factorul XIV – factorul de antisîngerare, anti-Wilebrand sau Nilsson, se remarcă prin funcție, și nu prin natura sa chimică.

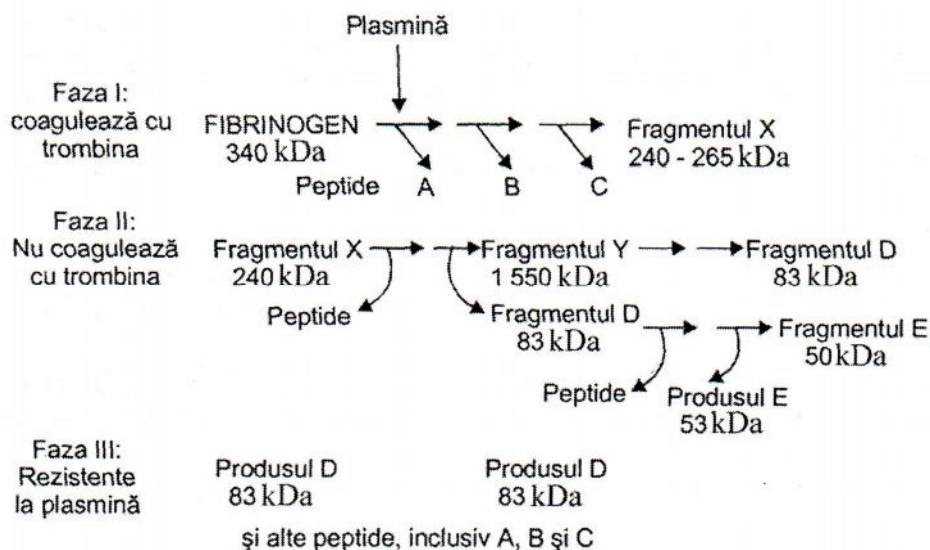
După formarea fibrinei insolubile, urmează *sinereza cheagului* prin eliminarea apei din ochiurile gelului, cu micșorarea spațiului dintre fibrile. *Retracția* se produce cu conflucrarea trombocitelor funcțional normale, ce acționează prin trombostenină (Fp7). ATP trombocitelor asigură contracția Fp7, care antrenează micșorarea în sens longitudinal al fibrelor de fibrină, înregistrînd pasiv atare rezultat.

Fibrinoliza este un proces încontinuu, la fel ca și coagularea, în cadrul căreia permanent se formează cantități neînsemnate de fibrină. S-a stabilit că una din globulinele plasmei – plasminogenul (profibrinolizina), la acțiunea unor factori tisulari sau sanguini, de altfel ca și la influența urokinazei urinei sau a streptokinazei microorganismelor, se reproduce în forma sa activă – *plasmina* (fibrinolizina). Se include mecanismul -cascadă analog cu căile intrin- și extrinsec ale sistemului de coagulare.

Plasminogenul este o serinprotează formată în hepatocite, prezentă sub formă inactivă în plasmă. Este alcătuit dintr-un singur lanț polipeptidic cu masa moleculară de 91 kDa. Spre capătul N-terminal format de lizină, lanțul peptidic formează cinci bucle, fiecare cu o afinitate deosebită de a fixa aminoacizi – lizina și arginina. Centrul activ e situat în capătul C-terminal. Plasminogenul se activează prin proteoliză – ruperea unei singure legături amidice între arginină și valină. În condiții fiziologice, activarea se desfășoară prin mecanismul intrinsec. *Urokinaza* este o serinprotează, sintetizată în rinichi, cu masa moleculară între 33 și 54 kDa. Cel mai puternic activator al plasminogenului este factorul tisular (ATPG). Ultimul este o serinprotează, cu masa moleculară 50 kDa, care se formează în celulele endoteliale și SMM. Pot transforma plasminogenul în plasmă activă și o serie de serinproteaze nespecifice de origine celulară ca: F.XIa, F.Xa, tripsina, elastaza etc.

Activarea plasminei prin mecanismul extrinsec se datorează factorilor exogeni ca streptokinaza A. Ea se fixează de plasminogen, formând un complex echimolar. În formă fixată, la o modificare conformațională, plasminogenul se activează parțial. Acest complex cu activitate proteolitică redusă transformă inițial câteva molecule de plasminogen, care prin autocataliză activează progresiv restul moleculelor. Deoarece se obține ușor, streptokinaza A se administrează cu succes în tratamentul fibrinolitic al trombozelor coronariene și ale altor vase. Dezavantajul metodei constă în imunogenocitatea puternică a substanței, cu consecințe negative în cazul administrării repetate.

Mecanismul de acțiune al plasminei este determinat de caracterul ei endoproteazic cu spectru larg, preferențial scindând legăturile peptidice ale argininei. În așa mod, plasmina activează prin proteoliză și o serie de alte preproteaze (F.XII, F.XI, protrombina), *in vitro* descompune cazeina și gelatina. Ca substrat al plasminei servește fibrina. În cazul în care este în exces, plasmina descompune atât fibrinogenul nativ, cât și o serie de factori și cofactori din plasmă. În urma activării sale, plasmina se fixează pe suprafața fibrelor de fibrină din cheag, din care eliberează prin proteoliză o serie de produși de degradare a fibrinei. Acești produși sunt totdeauna dimeri, fiindcă provin din peptidele învecinate (α , β și γ). Plasmina atacă și fibrinogenul. La începutul activării sale, plasmina eliberează prin proteoliză câte un fragment (A, B, C) din toate cele trei peptide (α , β și γ). Fibrinogenul rămas are o masă moleculară de 240 kDa și se numește fragmentul X. Acesta, mai departe, se scindează în două fragmente noi: fragmentul D (100 kDa) și fragmentul Y (100 kDa). Ultimul scindează rapid în încă două fragmente: fragmentul D și fragmentul E. În decursul fazei terminale a fibrinogenolizei se produc numai fragmentele D și E. FDP (fibrinogen degradation products) sunt totdeauna monomeri care, în urma activității transglutamidazice a factorului de stabilizare a fibrinei, formează exclusiv dimeri.



Mecanismul de acțiune a plasminei

Plasmina transformă pro-metaloproteinele matriciale în forma activă ce va favoriza degradarea matrixului extracelular.

Efectul proteolitic al plasminei este stopat de α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina și de antiplasmină – albumina plasmei cu efect antiproteolitic. Ca preparate medicinale ce rețin fibrinoliza se utilizează inhibitori ai proteazei de tipul acidului aminocaproic, trasilolului (acidul p-aminometilbenzoic), AMCHA (acidul aminometilciclohexanic).

Reglarea hemostazei

Se produce foarte fin, exact, deoarece formarea cheagului se realizează rapid și numai în regiunea țesutului lezat. Multe probleme nu sunt soluționate, să zicem: de ce reglarea hemostazei se efectuează în mai multe etape, cu participarea a 2 mecanisme? Cum sunt legate între ele? De ce are loc numai în regiunea afectată?

Un rol primordial îl joacă labilitatea factorilor activi ai coagulării, perioada lor de înjumătățire mică, diluția în sânge, neutralizarea în ficat, scindarea de proteaze, inactivarea lor de către inhibitori etc.

Viteza procesului de coagulare e mai lentă la:

- 1) temperaturi joase, la utilizarea ustensilelor cu suprafețe de silicon;
- 2) utilizarea substanțelor ce fixează Ca^{++} – oxalațiiilor de Na, K, NH_4 , citraților; compușilor chelați – trilon B (EDTA).

Protrombina, în urma activității sale, poate declanșa coagularea întregului volum plasmatic circulant. O asemenea coagulare intravasculară diseminată sau difuză, chiar și în urma unor leziuni vasculare serioase se manifestă deosebit de rar datorită existenței și funcționării unor mecanisme de reglare complexe care, prin interacțiunile lor, asigură menținerea echilibrului efectelor pro- și anticoagulante. Datorită faptului că trombina este enzima-cheie a coagulării plasmatice, majoritatea efectelor anticoagulante sunt îndreptate împotriva ei și manifestate de către diferite antitrombine (AT).

Trombomodulina (TM) prezintă un glicoproteid ce se expresează pe suprafața celulelor endoteliale, formînd complex cu trombina (1:1). În acest complex trombina își modifică specificitatea față de unele substraturi proteice – crește de 1000 de ori afinitatea față de proteina C și, activînd-o, o transformă într-un anticoagulant natural.

Antitrombina I reprezintă cheagul de fibrină. Trombina activă, fixată pe suprafața monomerilor de fibrină, este situată în interiorul cheagului, astfel blocîndu-și activitatea. Însă, în urma unei fibrinolize rapide pot fi eliberate cantități însemnate de trombină activă.

Antitrombina II înseamnă activitatea globală a antiproteazelor din plasmă, nespecifice trombinei, așa precum sunt α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina etc. Activitatea lor antitrombinică este, însă, limitată.

Antitrombina III este unicul inhibitor specific al trombinei. Reprezintă o glicoproteină formată dintr-un singur peptid, cu masa moleculară de 58 kDa și cantități normale în plasma sanguină de 0,1-0,12 g/L (2,5 μ mol/L). Ea formează cantități echimolare cu trombina, blocîndu-i activitatea. Dar pentru aceasta mai are nevoie de prezența unui cofactor numit *heparină*. În prezența heparinei, molecula de AT III este supusă unor modificări conformaționale, astfel mărindu-i afinitatea față de trombină. Respectiv, activitatea ei crește aproximativ de o mie de ori. AT III este activă și în raport cu alte serinproteaze FVIIa, nu numai cu F.Xa. Domeniul funcțional C-terminal interacționează cu proteinazele, iar cel N-terminal – cu două site-uri de fixare a heparinei și a heparan sulfatului proteoglicanilor de pe suprafața celulelor endoteliale. În decursul coagulării, AT III se consumă. De aceea, din cauza lipsei AT III administrarea heparinei în scop terapeutic poate să nu aibă efectul dorit. În asemenea cazuri, paralel cu heparina este recomandabilă și administrarea plasmei.

Heparin Cofactor II (HP II) este o glicoproteină cu masa moleculară de 65 kDa. Concentrația normală în plasma sanguină este de 90 mg/L (1,2 μ mol/L). La fel ca AT III, HP II inhibă trombina, dar nu și F.Xa. În cazurile rare ale lipsei congenitale a HP II apare o predispoziție ușoară spre tromboze, ceea ce ar indica rolul secundar al acestui factor în reglarea hemostazei.

Hirudina din saliva lipitoarelor este un peptid cu masă moleculară de 6 kDa, care inhibă direct trombina, fără prezența unui cofactor.

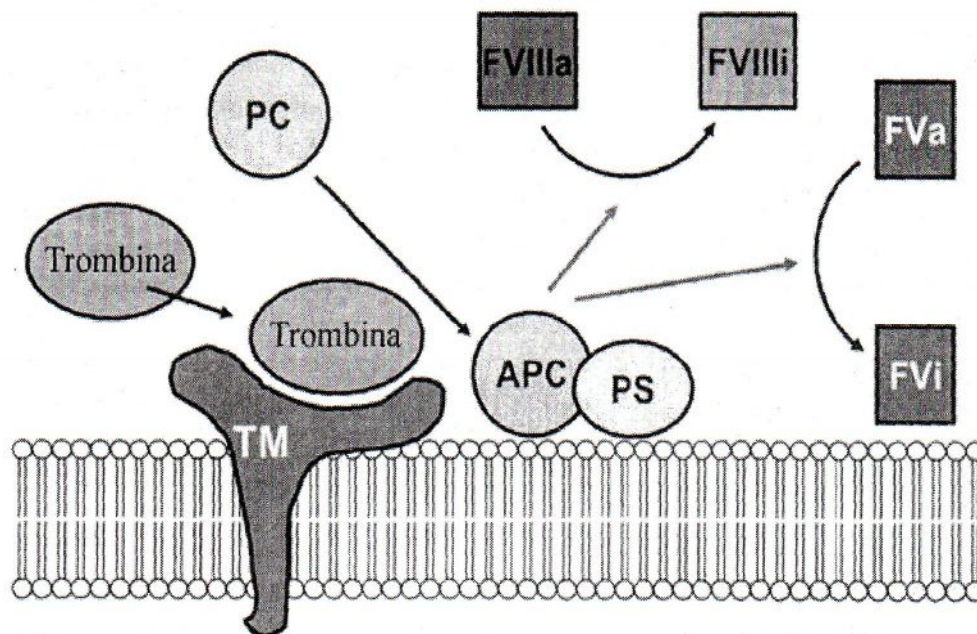
Antitrombina IV este reprezentată de cele două peptide (pretrombinele I și II) eliberate în cursul activității protrombinei. Aceste peptide, fixîndu-se pe suprafața trombinei, îi blochează centrul activ. Pretrombina II are un efect inhibitor și asupra polimerizării monomerilor de fibrină.

Antitrombina V reprezintă suma efectelor complexe antitrombice ale unor imunoglobuline libere sau cuprinse în particulele complexelor imune circulante care, fixîndu-se de trombină, pot bloca, parțial sau total, miezul ei activ.

Antitrombina VI cuprinde produșii de degradare (FDP: fragmentele D, X, Y, E) și combinațiile acestora, eliberate în cursul degradării fibrinogenului din plasmă. Aceste fragmente blochează, pe de o parte, centrul activ al trombinei, pe de altă parte, inhibă formarea și polimerizarea monomerilor de fibrină. Fragmentele X își păstrează coagulabilitatea, care poate fi declanșată prin adăugarea *in vitro*, la plasmă, a etanolului sau a sulfatului de protamină. Fenomenul se numește *paracoagulare* și este folosit ca

test de laborator în explorarea stărilor de coagulare intravasculară diseminată.

Proteina C este o serinprotează β globulinică de origine hepatică, dependentă de vit.K, care în prezența cofactorului proteina S și a fosfolipidelor descompune proteolitic cofactorii activi V, VI, și VIII. Este activată de excesul de trombină și inactivată de o altă protează glicoproteică numită *inhibitor APC*. Cele redată sunt ilustrate în schema de mai jos.



Proteina S, dependentă de vit.K, fiind un complex cu APC majorează de 10 ori afinitatea ultimei la fosfolipidele celulelor endoteliale și ale trombocitelor. Interacțiunea accelerează peste 20 ori capacitatea complexului PC-PS de a inactiva F.Va.

În serul sanguin, aproximativ 40% de proteină S este în stare liberă, cealaltă cotă – în complex cu reglatorul proteic al căii clasice a complementului C4b-BP. Numai fracția liberă posedă funcție de cofactor. Ca și proteina C, este un cofactor stabil care se consumă în decursul coagulării.

Efectele analogice sunt caracteristice:

- 3) derivaților cumarolului – inhibitori competitivi ai vitaminei K;
- 4) veninul șerpilor posedă efect antitromboplastinic;
- 5) tabaninei - substanță antitrombinică, conținută în saliva unor insecte ce sug sânge.

Concentrația proteinelor hemostaziei *in vivo* oscilează în limite mari: de la nanomoli (FVIIa, VIII) la micromoli (F I, II) (vezi tabelul.8.3), conform DiaSys Diagnostic Systems, 2005.

Tabelul 8.3. Masa moleculară și concentrația medie în plasmă a proteinelor de coagulare și inhibitorilor

Proteina	Concentrația medie în plasmă		Masa moleculară în Da
1. Fibrinogen	-	1,8 -3,6 g/L	340,000
2. Protrombina (II)	1,4 μmol/L	100-150 mg/L	72,000
3. Factorul tisular(III)	-	110-180 ng/L	44,000
4. Factorul V	30 nmol/L	0,01 g/L	330,000
5. Factorul VII	10 nmol/L	0,5 mg/L	50,000
6. Factorul VIIa	-	0,005 μg/L	50,000
7. Factorul VIII	0,3 nmol/L	100 μg/L	285,000
8. Factorul IX	90 nmol/L	5,1 mg/L	57,000
9. Factorul X	180 nmol/L	10 mg/L	58,500
10. Factorul XI	30 nmol/L	4,8 mg/L	160,000
11. Factorul XIII	30 nmol/L	10 mg/L	320,000
12. Proteina C	65 nmol/L	3,7 mg/L	62,000
13. Proteina S	140 nmol/L	10 mg/L	69,000
14. Trombomodulina	-	2,7-5,4 μg/L	100,000
15. Antitrombina III	2,5 μmol/L	200 mg/L	58,000
16. IFT (inhibitorul factorului tisular)	-	75-120 μg/L	40,000

Majoritatea factorilor de coagulare sunt *serinproteaze*, la fel ca și cele eliberate din micro- și macrofage în procesul inflamațiilor. Aceste serinproteaze se pun în libertate sau se găsesc în lichidele biologice, inclusiv plasmă, sub forma proenzimelor inactive, care se activează tot prin proteoliză de către alte serinproteaze deja active. Ca urmare, activarea prin proteoliză sau prin contact a unui fel de serinprotează, poate să ducă practic la activarea tuturor proenzimelor de acest gen. Ansamblul acestor enzime (proteine scindatoare de proteine) formează în organism un *sistem proteolitic autoamplificator*, cuprinzând numeroși reprezentanți ai enzimelor lizozomale, leucocitare și plachetare, ai factorilor de coagulare, de properdină și de complement. Activarea individuală și globală a acestora este însă controlată în spațiu și timp de către antiproteazele din plasmă și din lichidul interstițial. Ca urmare, gradul de manifestare a unei coagulopatii, respectiv gravitatea și extinderea unei inflamații, sunt determinate de raportul momentan între activitatea serinproteazelor și a antiproteazelor.