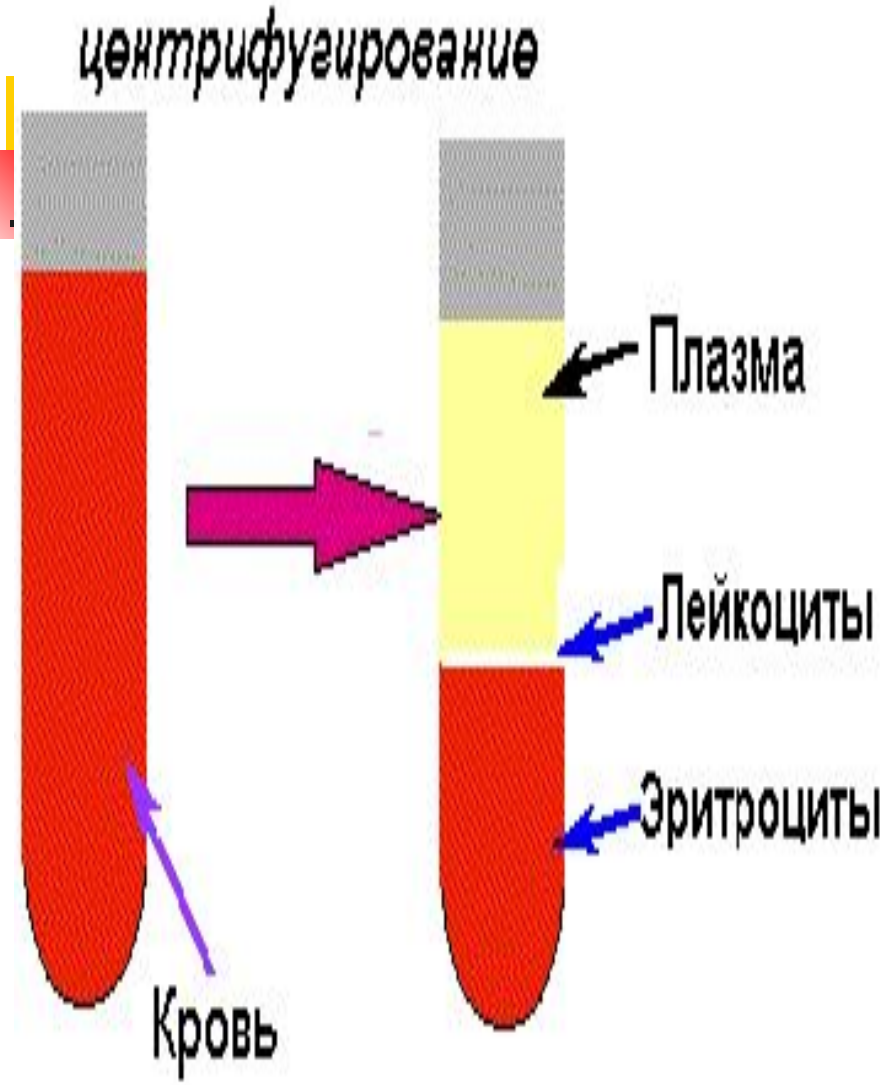
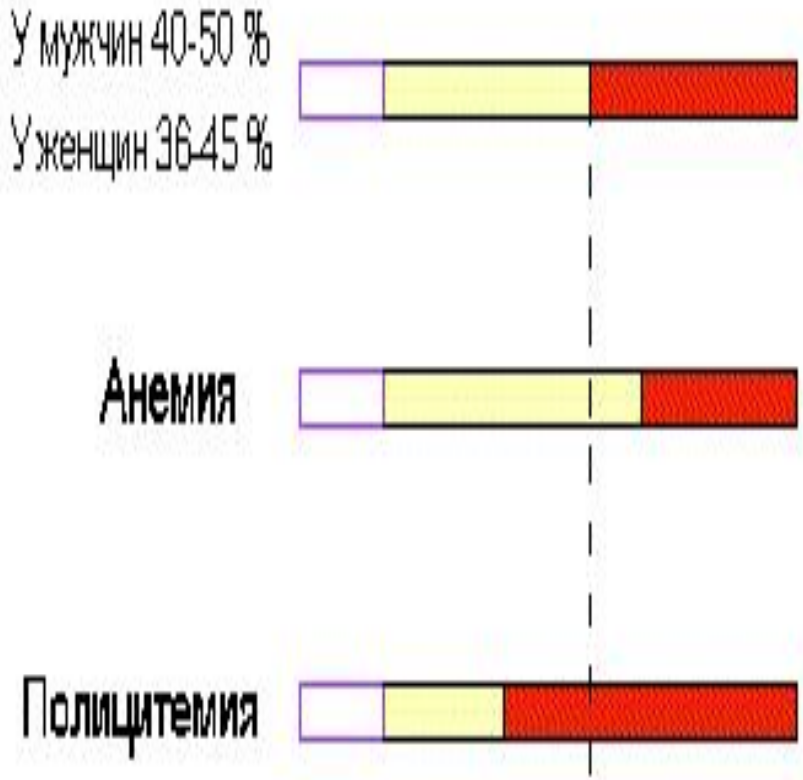
Биохимия крови - 1

д.м.н., проф. Грицук А. И.

Внутренняя среда организма формируется совокупностью биологических жидкостей (кровь, лимфа, тканевая жидкость), омывающих клетки и структуры тканей. Эти жидкости функционально тесно взаимосвязаны, они постоянно обмениваются между собой клетками и молекулами.





$$\text{Гематокрит} = \frac{\text{Объем клеток крови}}{\text{Общий объем}} \times 100$$

Химический состав плазмы

Основные функции крови

- ***Дыхательная*** -транспорт O_2 от легких к тканям и CO_2 наоборот
- ***Выделительная*** **-** транспорт конечных метаболитов к органам выделения (почкам, легким, коже, потовым железам, ЖКТ) для удаления.
- ***Защитная*** (иммунитет, гемостаз и др.)
- ***Транспортная***

1. ***Трофическая*** - транспорт пищевых субстратов и метаболитов, обеспечивающих основные жизненные потребности клетки
2. ***Регуляторная*** (КОС, водно-электролитный баланс, t°, метаболизма – транспорт БАВ и др.).
3. ***Интегративная (креативная)***

Химический состав крови

Большую часть этих функций выполняют компоненты плазмы крови.

- *Плазма крови состоит на* ***90-93%*** *из воды* и ***10-7%.*** сухого остатка – белки, углеводы, липиды,, органич. метаболиты и электролиты
- Сухой остаток на **6,6-8,5**% состоит из белков плазмы крови и **1,5-3,5%** - органических метаболитов (углеводы, липиды, азотосодержащие продукты) и электролитов (*Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+} , Cl^{-}, HCO^{3-}* и др.).
- Водный и электролитный состав плазмы очень похож на состав др. внеклеточных биологических жидкостей.
- Лабораторный мониторинг уровней *Na+, K+, Ca2+, Cl-, HCO3- и pH* крови важны для оценки состояния метаболизма.

Характеристика белков плазмы крови

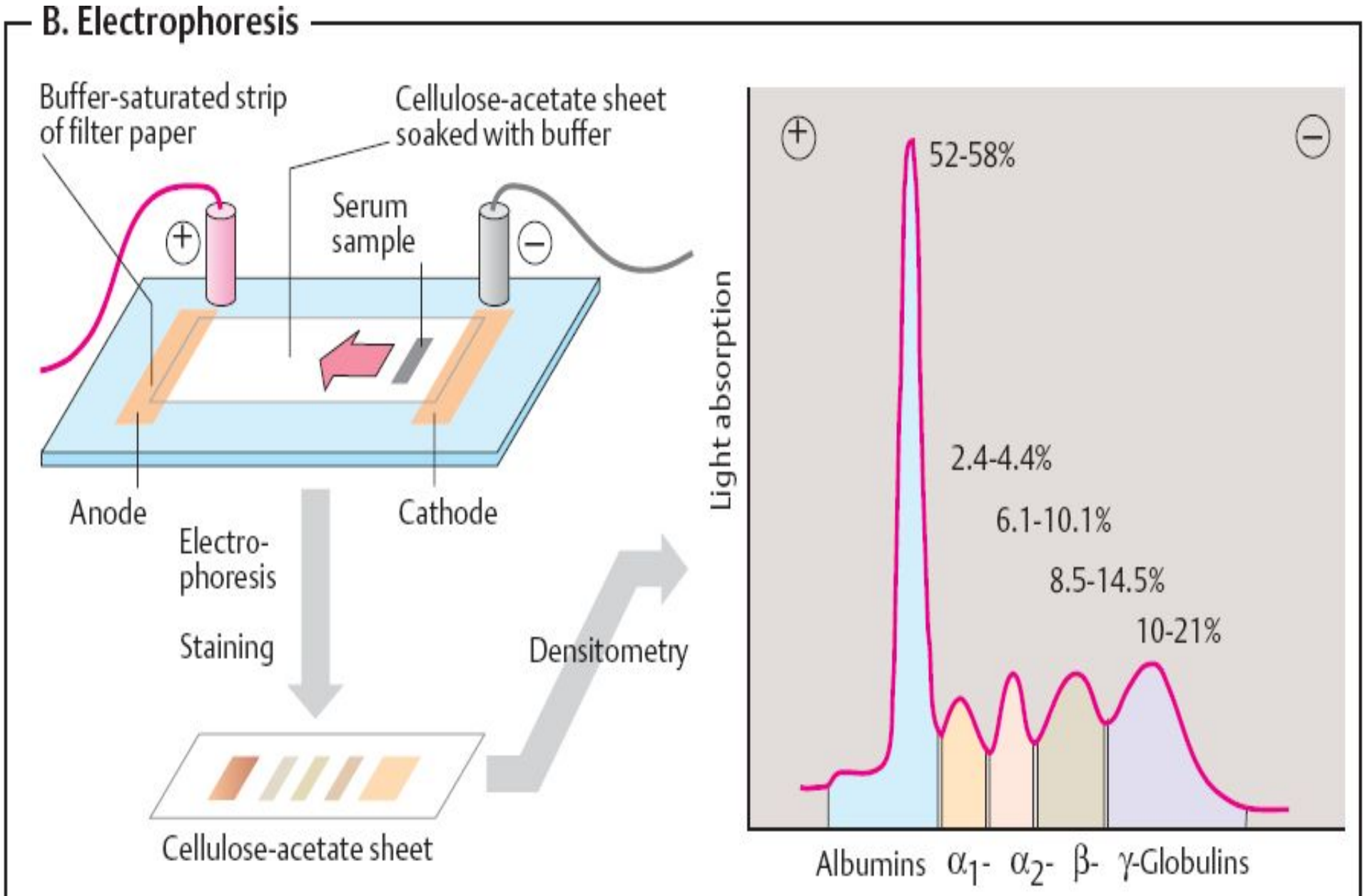
1. содержатся в плазме крови
2. синтезируются в печени или РЭС (реже в спец. тканях)
3. проявляют основную функцию в пределах сосудистой системы
4. секретируются в кровь, а не попадают в результате повреждения тканей
5. находятся в плазме в концентрации большей, чем в других биологических жидкостях
6. проявляют генетический полиморфизм, имеют вариантные формы, не связанные с тканевым происхождением
7. не являются продуктами катаболизма в плазме, но могут быть продуктами ограниченного протеолиза
8. имеют большее время биологического полураспада в плазме, чем время транспорта по крови.

Состав белков плазмы крови

- В плазме обнаружено более ***100*** разных белков соответствующих этим критериям, содержание которых колеблется в широких пределах
- Изучение их функций, содержания, состава при патологии — одна из важных задач клинической биохимии.
- Уровень **~10** белков составляющих ***90 %***, и называемых **главными** достигает высоких значений (альбумин – ***40 г/л***).
- Остальные ***10 %*** **минорные**, следовые белки.

приходится свыше 100 различных белков, содержание которых может быть в пределах ***50 – 200 мкг/л***.

Электрофорез белков плазмы

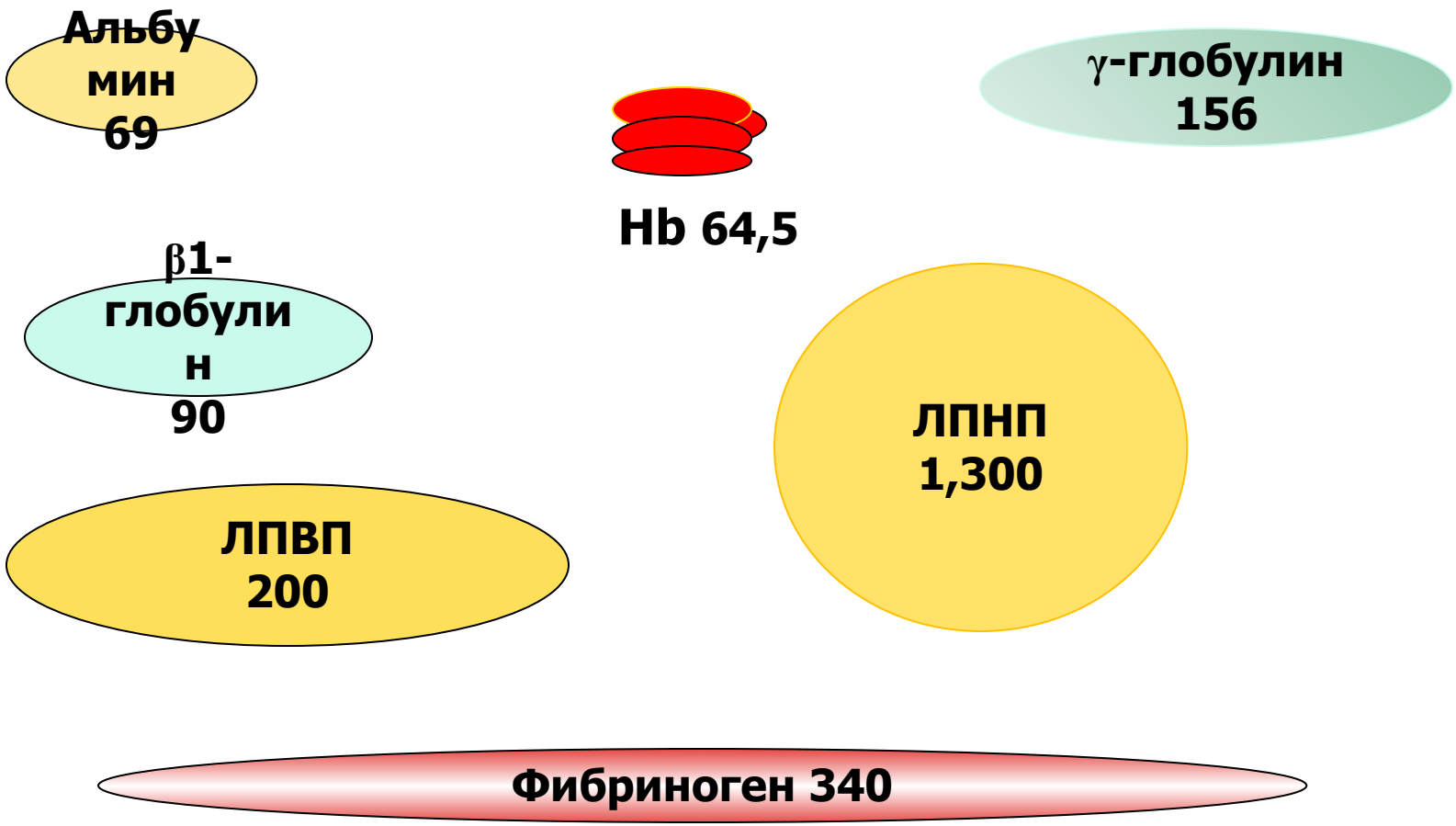


Белковые фракции

A. Plasma proteins

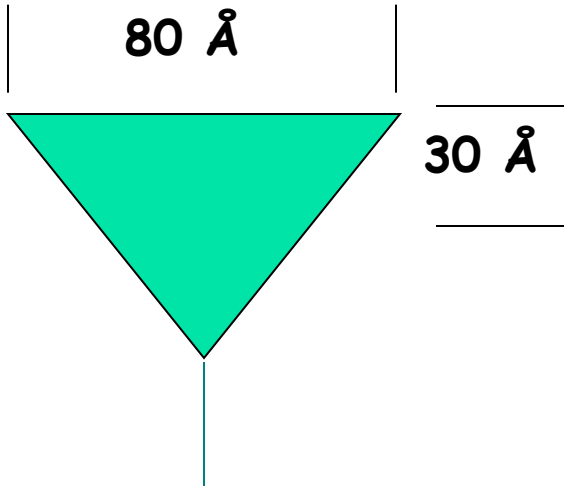
Group	Protein	M_r in kDa	Function
Albumins:	Transthyretin	50-66	Transport of thyroxin and triiodothyronin
	Albumin: 45 g · l^{-1}	67	Maintenance of osmotic pressure; transport of fatty acids, bilirubin, bile acids, steroid hormones, pharmaceuticals and inorganic ions.
α_1-Globulins:	Antitrypsin	51	Inhibition of trypsin and other proteases
	Antichymotrypsin	58-68	Inhibition of chymotrypsin
	Lipoprotein (HDL)	200-400	Transport of lipids
	Prothrombin	72	Coagulation factor II, thrombin precursor (*3.4.21.5*)
	Transcortin	51	Transport of cortisol, corticosterone and progesterone
	Acid glycoprotein	44	Transport of progesterone
	Thyroxin-binding globulin	54	Transport of iodothyronins
α_2-Globulins:	Ceruloplasmin	135	Transport of copper ions
	Antithrombin III	58	Inhibition of blood clotting
	Haptoglobin	100	Binding of hemoglobin
	Cholinesterase (3.1.1.8)	ca. 350	Cleavage of choline esters
	Plasminogen	90	Precursor of plasmin (*3.4.21.7*), breakdown of blood clots
	Macroglobulin	725	Binding of proteases, transport of zinc ions
	Retinol-binding protein	21	Transport of vitamin A
	Vitamin D-binding protein	52	Transport of calciols
β-Globulins:	Lipoprotein (LDL)	2.000-4.500	Transport of lipids
	Transferrin	80	Transport of iron ions
	Fibrinogen	340	Coagulation factor I
	Sex hormone-binding globulin	65	Transport of testosterone and estradiol
	Transcobalamin	38	Transport of vitamin B_{12}
	C-reactive protein	110	Complement activation
γ-Globulins:	IgG	150	Late antibodies
	IgA	162	Mucosa-protecting antibodies
	IgM	900	Early antibodies
	IgD	172	B-lymphocyte receptors
	IgE	196	Reagins

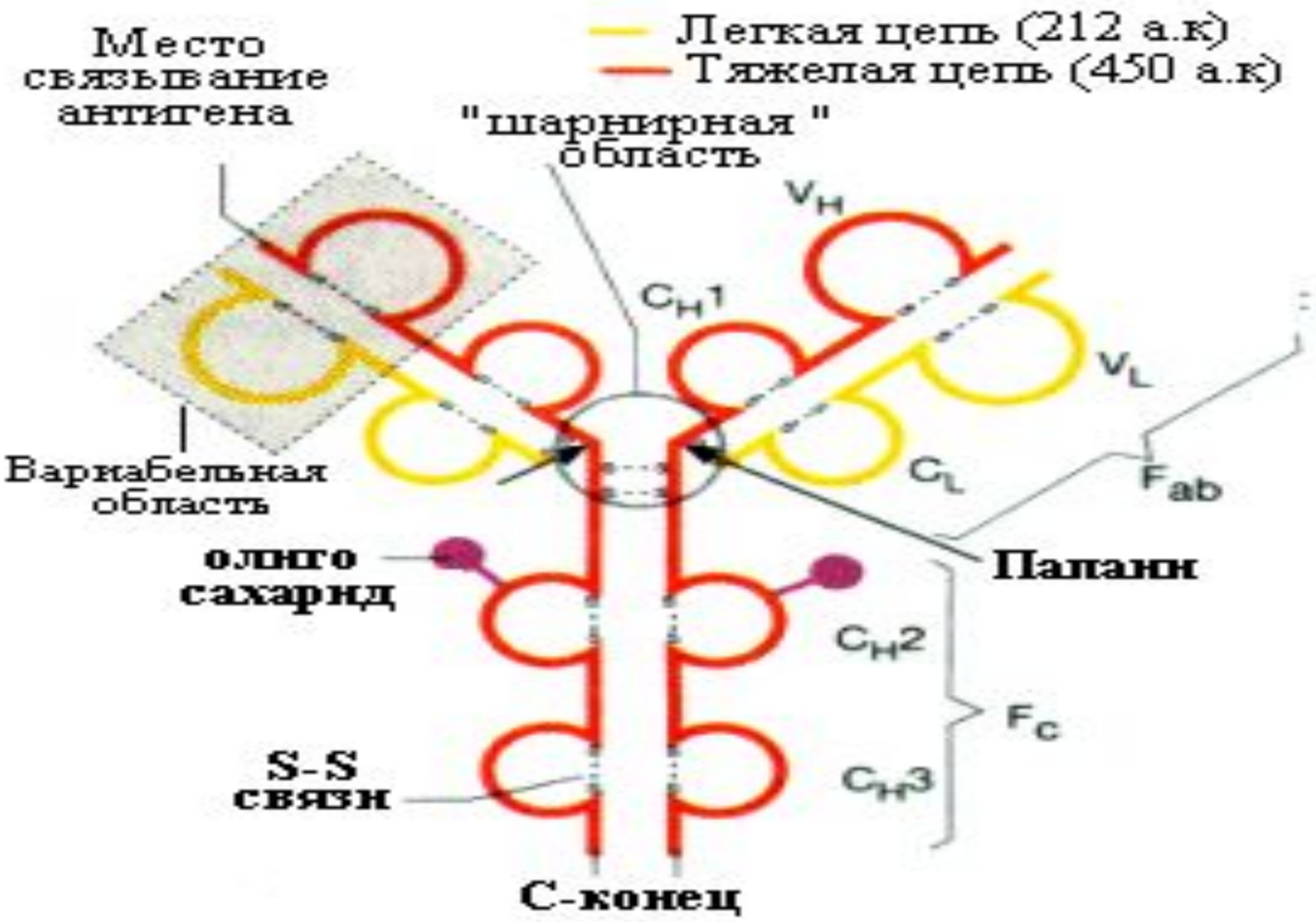
Относительные размеры и приблизительная молекулярная масса белков крови (kDa)

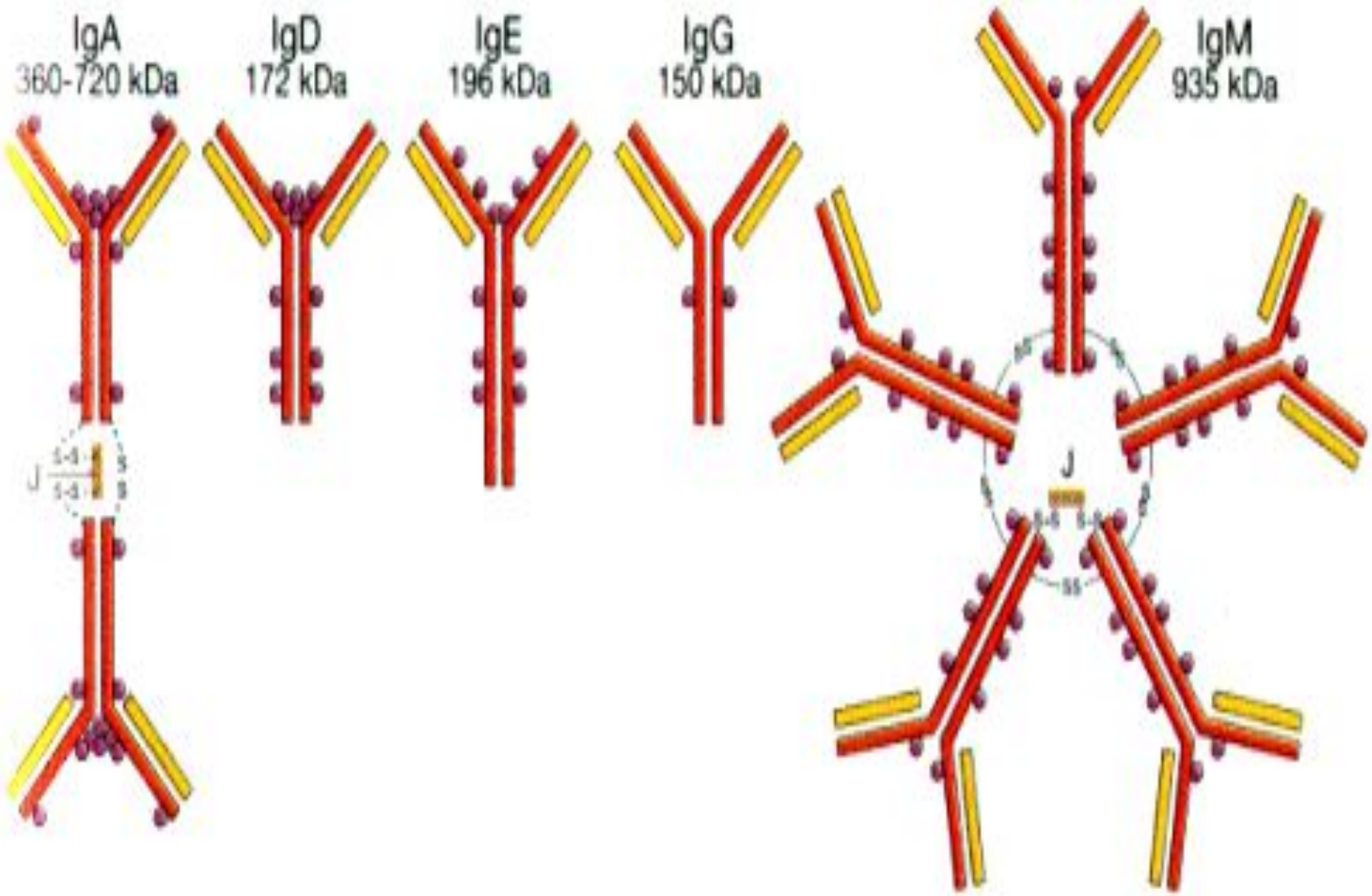


Альбумин

- Мм 69 kDa
- Единственная цепь иэ 580 АК, первичная структура известна
- Форма сердца
- 50% α цепь [*He & Carter, Nature, 358 209 (1992)*]
- Модель:




Легкая цепь (212 а.к)
Тяжелая цепь (450 а.к)
Место связывание антигена
"шарнирная " область
V_H
C_H1
V_L
C_L
F_{ab}
Варнабельная область
олиго сахарид
Папаин
C_H2
F_c
C_H3
S-S связи
С-конец


IgA
360-720 kDa
IgD
172 kDa
IgE
196 kDa
IgG
150 kDa
IgM
935 kDa
J
J

Функциональная классификация белков плазмы

1. Транспортная *а. специф. Б. неспециф*
2. Резервная ~ ***50%*** *альбумина*
3. Регуляторная *колл-осм давление (1гр альбумина связывает 17 мл воды)*
4. Защитная *а. гемостаз б. Ig, лизоцим и др,*

   в. связывание и транс токсинов

Остаточный азот

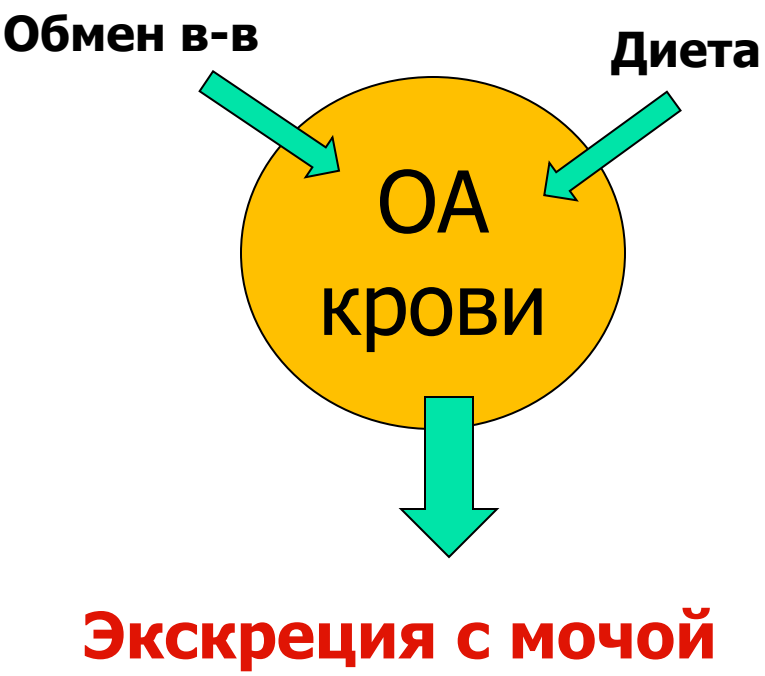
Все азотсодержащие вещества плазмы образуют общий пул азота, состоящий из:

- *Азота белкового – осаждаемого кислотами*
- *Азота небелкового* (*остаточного*) (**ОА**), представленного конечными продуктами обмена *АК, ФЛ, АО, Амины* и др. азотсодержащих в-в, которые остаются после осаждения белков

Состав ОА

- Мочевина - 50% (главный компонент)
- АК - 25% (~ 10% *ГЛУ и ГЛН*)
- Ураты - 8%
- Креатинин - 2.5%
- NH_3 и индикан - 0.5%
- билирубин, нуклеотиды, биогенные амины, метаболиты АК, АО, холин, олигопептиды и др

Ds значение ОА



Уровень ОА зависит от:

- Интенсивности катаболизма
  - Травмы (*ожоги, краш-синдром*)
  - Распад тканей (*tbc, c-r, etc*)
  - Гнойно-воспалит процессы
  - О радиационные травмы и др.
- Питания
  - Кол-во белка, НК *и др.*
- **Экскреторной функции почек**
  - ОПН, ХПН, др поражения почек
  - Нарушение кровообращения почек

Азотемия - повышение уровня ОА в крови

- Ретенционная – задержка компонентов ОА в организме из-за нарушения экскреторной функции почек
  - ***Почечная*** *азот мочевины составляет* ***90%*** *ОА крови (норма* ***50%****) (ОПН, ХПН – отравления, травмы, гломерулонефриты, пиелонефриты и др поражения почек)*
  - ***Внепочечная*** *азотемия возникает при снижения почечного кровотока из-за недостаточности кровообращения, снижения АД (шок, коллапс, большая кровопотеря)*
- Продукционная – увеличение продукции ОА за счет катаболизма
- Комбинированная

Общие понятия КОС

КОС – система гомеостаза pH внутри- и внеклеточной среды организма.

Единицы измерения **:pH = -lg [H+],**

сдвиг pH:

на **1ед** соответствует **10 кратному** изменению **[H^+]**

на **2ед** соответствует **100 кратному** изменению **[H^+]**

- pH внутри клеток ***pH_i ~ 6.9 – 7.0***
- pH вне клеток ***pH_o =7.40±0.04*** **[H^+]** ~ ***40 ±0.5 нМ/л***

- ***Кислоты –*** доноры **H^+**
- ***Основания –*** акцепторы **H^+**
- ***Щелочи -*** доноры ***OH^-***
- ***Буфер*** система состоит из слабой кислоты и ее соли, образованной сильным основанием, стабилизирует pH,

NB!

- С одной стороны : стабильный pH необходимое условие нормального метаболизма
- С другой : pH производное метаболизма

pH – производное метаболизма

1. За сутки организм ***hs*** образует *50-100 мМ* $[H^+]$ на 15-20л ВКЖ.

- Весь метаболизм представлен гл. обр. обменом кислот (Г6Ф, ЖК, АК и др.):

- Распад 100г Б дает **~ 30 мМ H_2SO_4** и **100 мМ $H_2PO_4^-$** *поэтому белковая пища «кислая»*
- Распад 100 г Л дает **~ 17 мМ $H_2PO_4^-$** (ФЛ)
- постоянно образуется **ПВК, лактат, ацетат** и др.

- накопление оснований идет значительно меньше: **OH^-**, **NH_3**, **основных АК, креатинина** и др, которые вместе с буферами стабилизируют pH

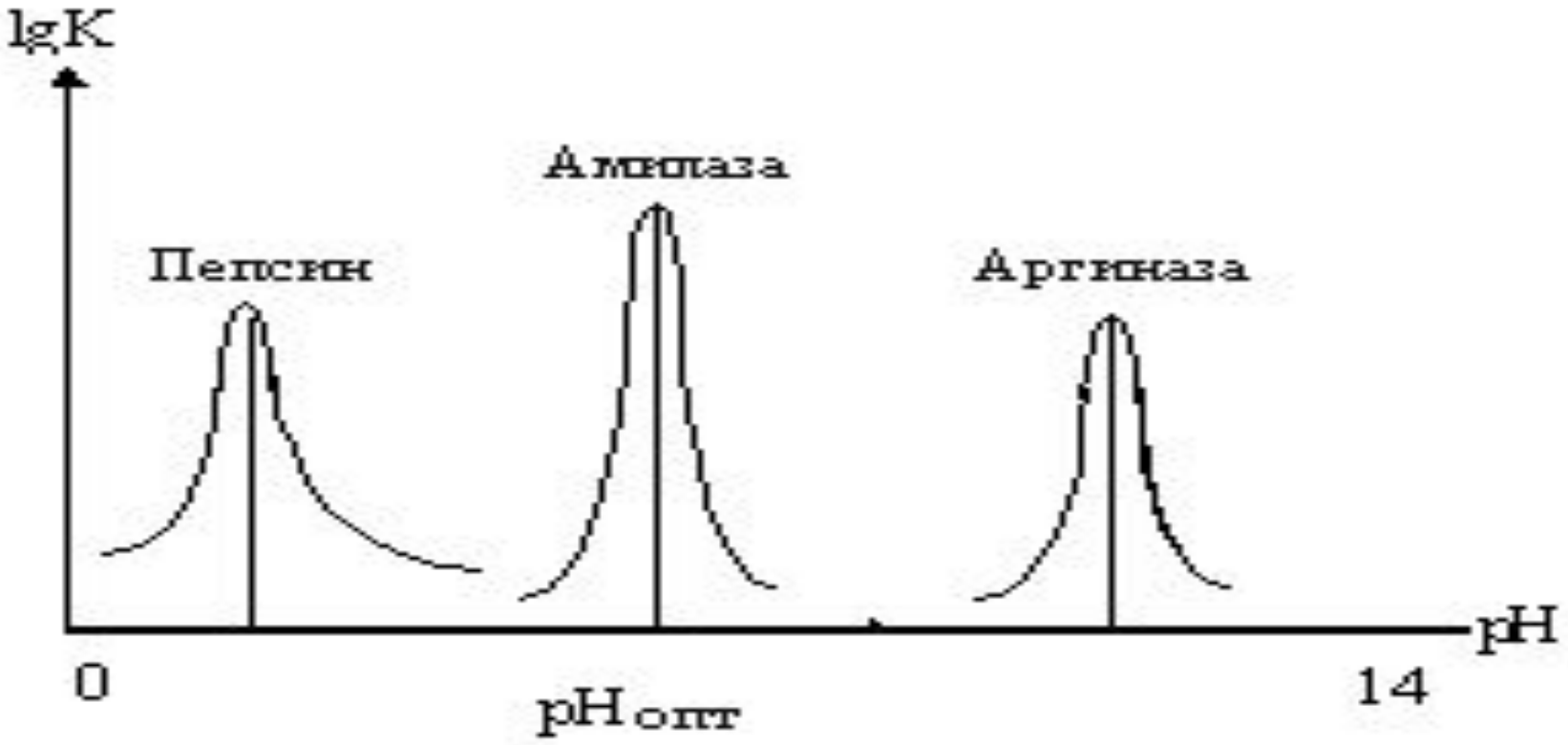
Стабильный pH - необходимое условие метаболизма

Изменение pH приводит к изменению:

заряда и функции белков (*ферментов, каналов, рецепторов и др*.), что обуславливает:

- pH зависимость всех б/х реакций и многих физиологических процессов в организме
- Наличие мощной гомеостатической системы стабилизации pH

Оптимум pH разных ферментов



Принципы организации КОС

- Изоосмолярность – осм. давление=**310** осМ/л - const

  любые изменения должны поддерживать эту константу
- Электронейтральность – *(по **155 мМ**-катионов и анионов)*
- Постоянство pH

Диаграмма Гэмбла

Состав плазмы крови

Метаболит	Концентрация, мМ
Глюкоза	3,6 - 6,1
Лактат	0,4 - 1,8
Пируват	0,07 - 0,11
Мочевина	3,5 - 9,0
Мочевая кислота	0,18 - 0,54
Креатинин	0,06 - 0,13
Аминокислоты	2,3 - 4,0
Аммиак	0,02 - 0,06
Липиды (суммарные)	5,5 - 6,0 г/л
Триацилглицерин	1,0 - 1,3 г/л
Холестерин	1,7 - 2,1 г/л

Механизмы регуляции КОС

1. Физико-хим – действует в автоматическом режиме и представлен:
   - разбавлением т.е. выходом **H^+** или др. иона из одного компартмента в др. (*из клетки в МКЖ или наоборот*)
   - активность буферных систем (см типы, мех-мы действия БС

2. Физиологические – функция экскреторных органов (выделение или задержка **H^+** или др. иона) – легкие, почки, ЖКТ и др.

Классификация нарушений КОС

- $pH_o = 7.40 \pm 0.04$

pH = 7.35 и ниже ***– ацидоз***

pH = 7.45 и выше ***– алкалоз***

По этиологии:

1. *Респираторный (дыхательный, газовый)*
2. *Метаболический*
3. *Выделительный*
4. *Смешанный*

По степени компенсации:

1. *Компенсированный*
2. *Декомпенсированный (выраженное истощение буферных систем и сдвиг значений pH)*

Механизм развития респираторных нарушений КОС

Ацидоз

$$CO_2 + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

Алкалоз

Причины: *изменение частоты дыхания (гипо- или гипервентиляция)*

Межорганное взаимодействие в регуляции pH

Если этих респираторных механизмов недостаточно, то активируются др. экскреторные системы.

- В печени снижение pH ингибирует биосинтез мочевины.

$$NH_3 + HCO_3^- \text{---}\square \text{ мочевина}$$

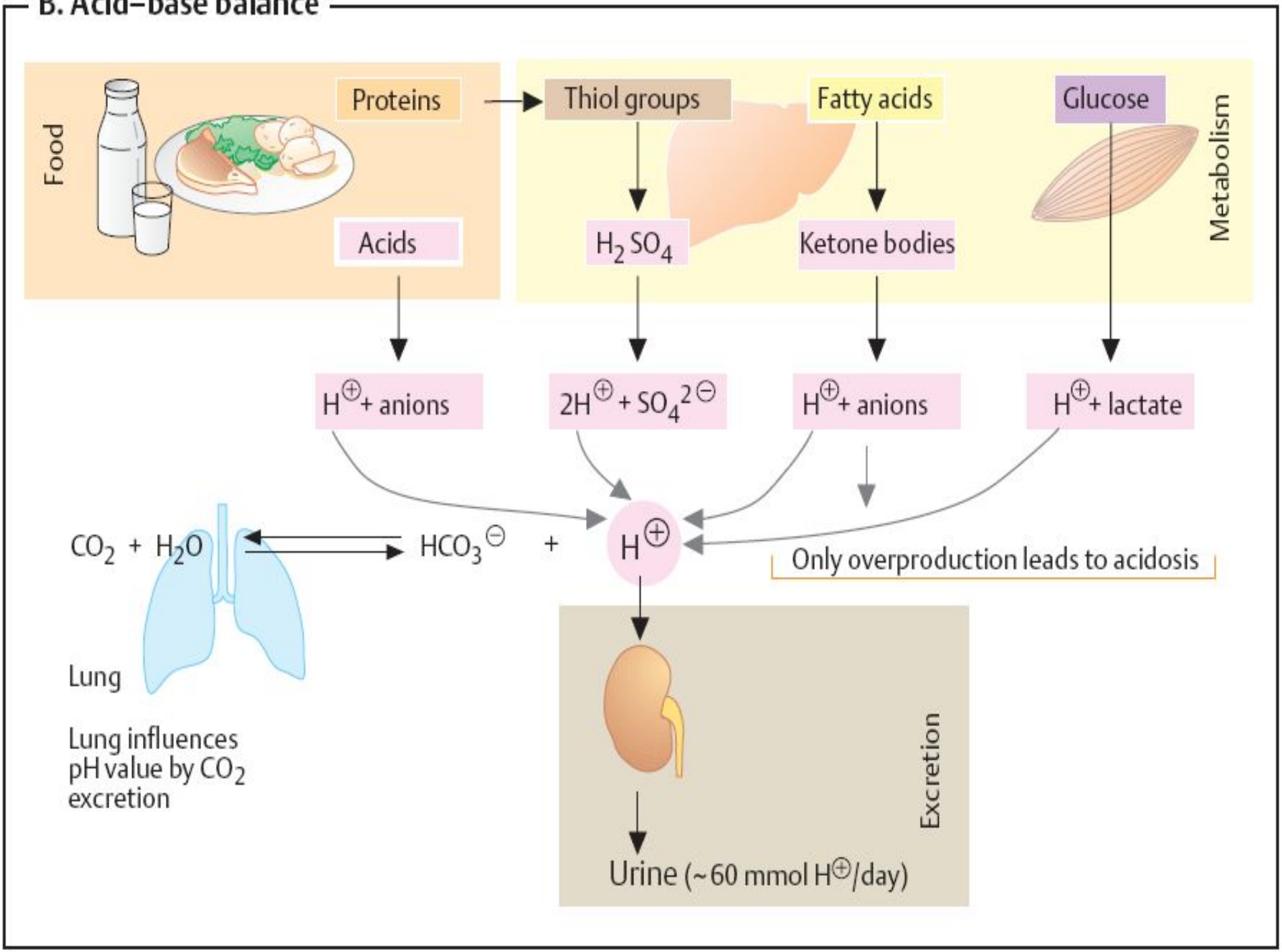
- В почках – ацидо- и аммониогенез – подкисление мочи и одновременно «подщелачивание» крови (за счет поступления HCO^{3-} в плазму). Детоксикация NH_3 происходит путем аммониогенеза

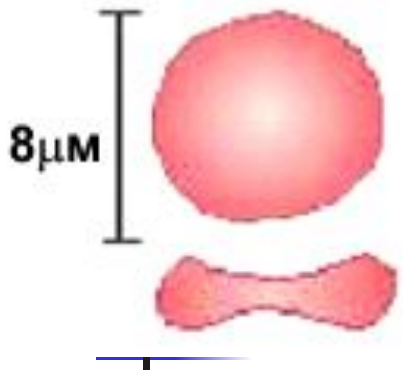
Межорганное взаимодействие в регуляции pH (*прод.*)

Активация ГНГ (органические *к-ты превращаются в нейтральную глюкозу*)

- Цикл Кори (*глюкозо-лактатный*)
- Цикл Фелига (*глюкозо-аланиновый*)

B. Acid–base balance





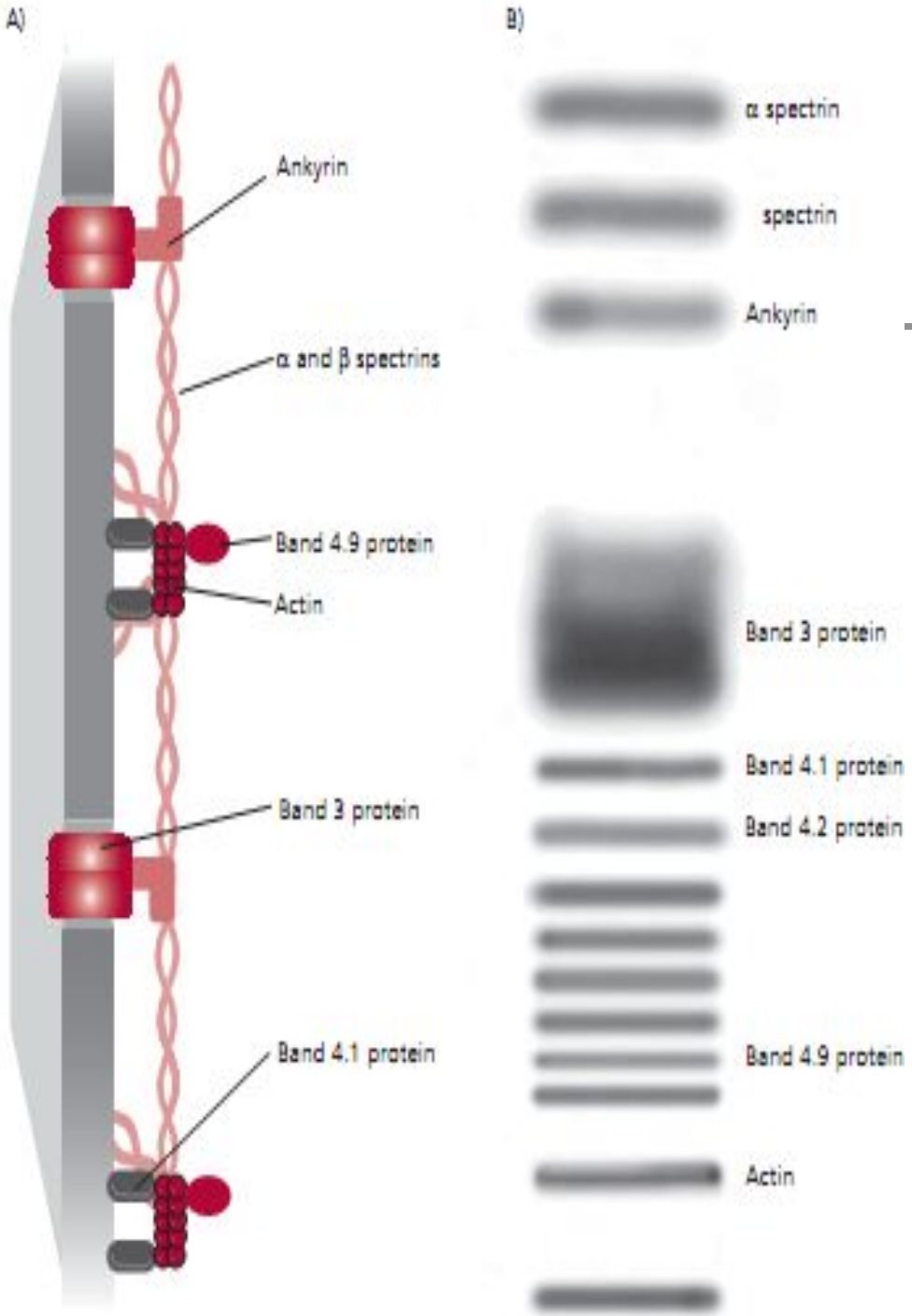
Эритропоэтин (**Эпо**)

- **Эпо** – цитокин, специфический регулятор эритропоэза в костном мозге
- **Эпо** человека – гликопротеид, состоит из 193 АК (ММ -21,28 kDa), синтезируется почками и печенью, скорость его секреции в кровоток возрастает при гипоксии.
- **Эпо** взаимодействует в костном мозге с клетками-мишенями при участии рецептора со свойствами тирозинкиназы способствуя их пролиферации и дифференцировке Вторичный посредник и специфичные гены к настоящему времени не установлены.
- Действие **Эпо** усиливается другими факторами (ИЛ-3 и ИПФР).
- Рекомбинантный **Эпо** используется в лечении анемий.

Э общий обзор

- Кол-во **Э** у мужчин - 4.6-6.2 млн/мкл крови, а у женщин - 4.2-5.4 млн/мкл. Общее количество **Э** в кровотоке ~**2.5×10^{13}**.
- Продолжительность жизни **Э** - 120 суток.
- Ежедневно обновляется ~1 % популяции **Э** кровеносного русла (200 млрд клеток или 2 млн/сек).
- «Старые» **Э** разрушаются клетками РЭС (селезенка, костный мозг и печень). Образующиеся при распаде гема желчные пигменты выделяются, а **Fe** и АК глобина используются повторно.
- Увеличение кол-ва **Э** в крови называют полицетемией, снижение – анемией.

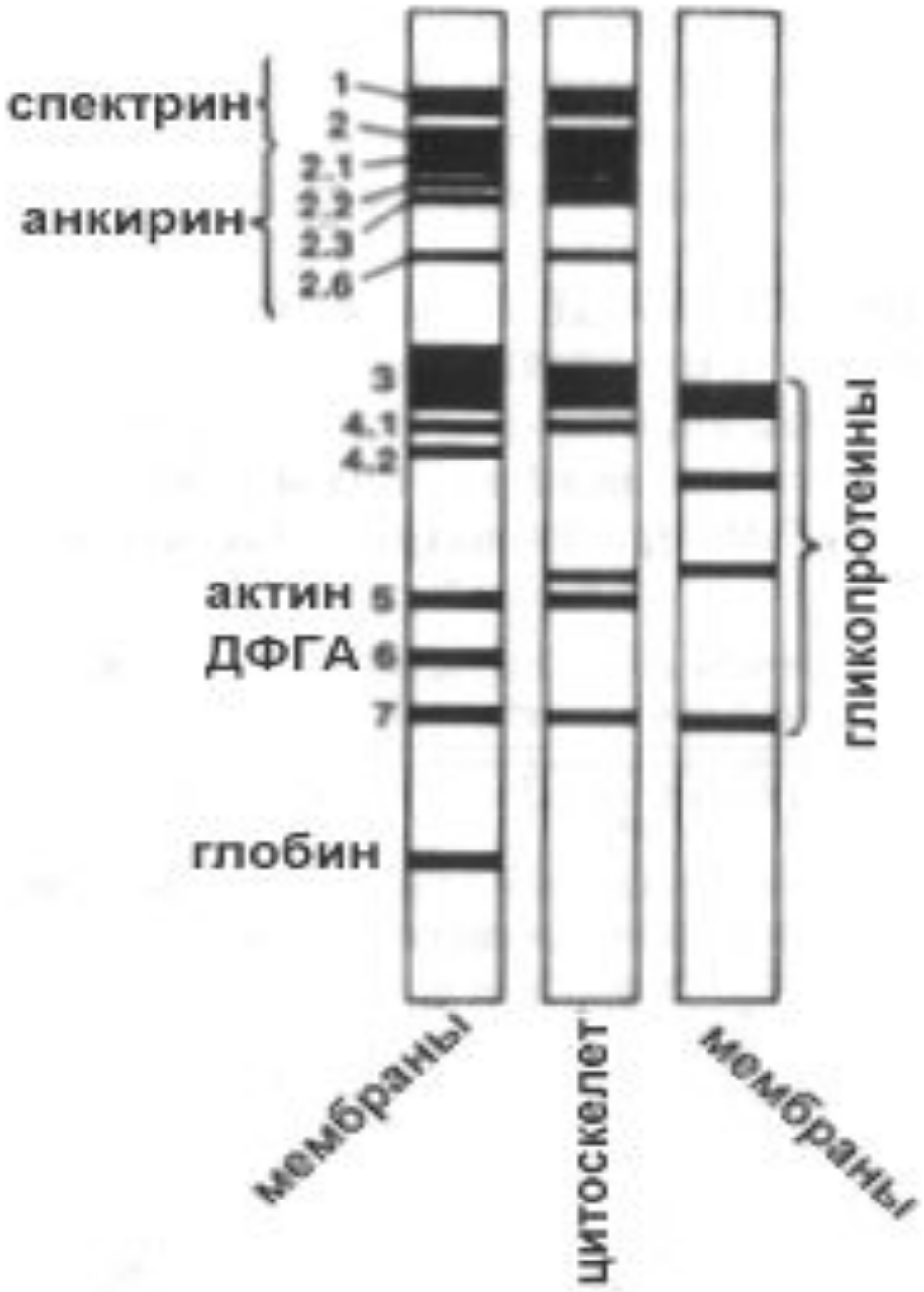
Цитоскелет Э



Белки цитоскелета Э

- α-спектрин
- Спектрин
- Анкирин
- Полоса 3
- Полоса 4.1
- Полоса 4.2
- Полоса 4.9
- Актин

Белки Э



1. Часть белков **Э** явл общими для мембран и цитоскелета:
   - *Спектрин*
   - *Анкирин*
   - *Актин*
   - *Фракция 4.1 и 7*

2. ДФГА – ЗФГА ДГ-мембранный белок

3. Поверхностные белки в основном гликопротеиды

Структура цитоскелета Э

Большинство мембран Э - интегральные Б, гликопротеиды.

- Б без углеводной части находятся на внутренней поверхности мембраны:

1. Ферменты - 3ФГА ДГ,
2. структурные белки (спектрин или актин) и Hb.
3. анкирин 3 обеспечивает, связь спектрина с цитозольном концом белка полосы 3 с бислоем ФЛ

- актиновые филаменты взаимодействуют с несколькими молекулами спектрина , формируя единую молекулярную сеть в мембране эритроцита.

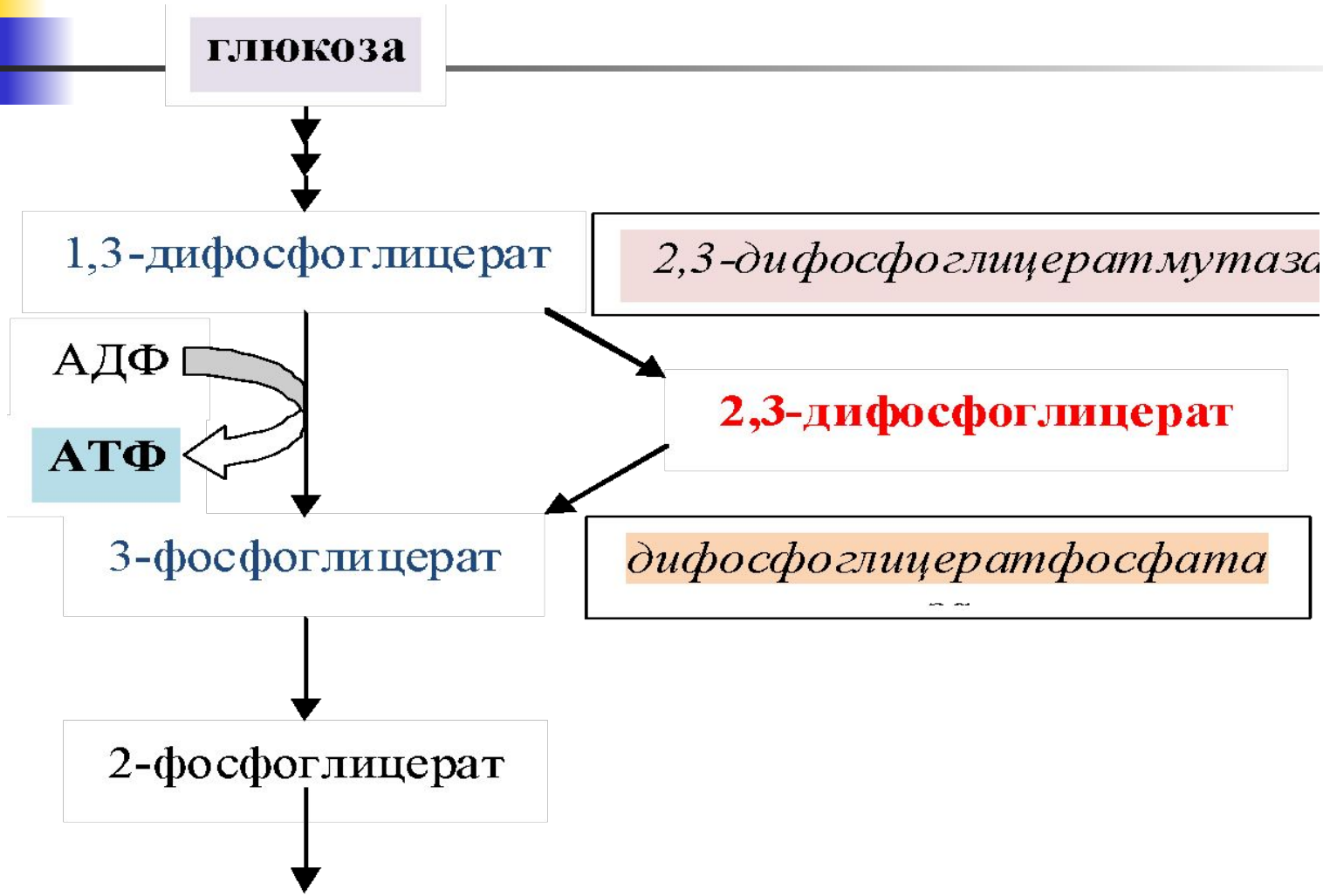
Метаболизм глюкозы в Э

- ***Абсолютно глюкозозависмые*** **клетки**
- ***Инсулиннезависимый*** **транспорт глюкозы**

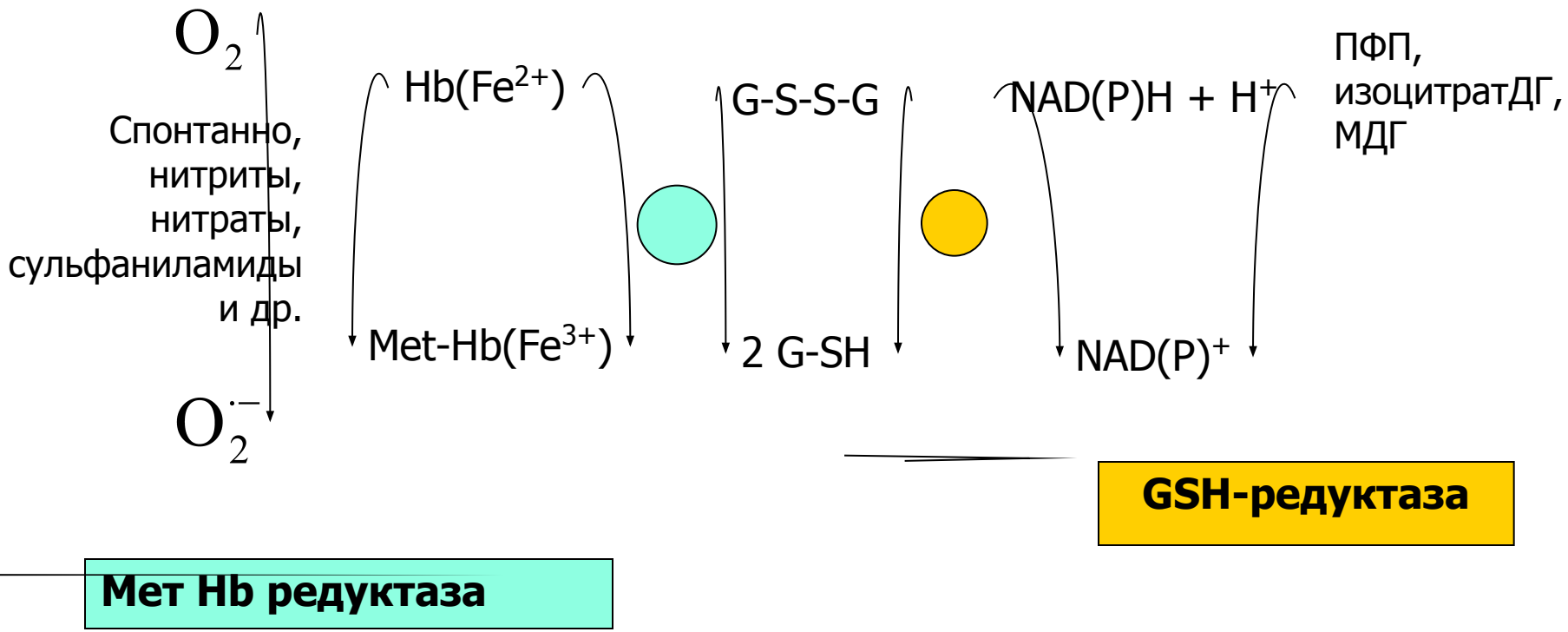
- **Гликолиз** (90-95%) **– образование АТФ**
- **ПФП** (10-5%) **- образование *NADPH*** (АОЗ)

- *Особенностью* обмена в Э является боковой путь, ответвляющийся на уровне 1.3-ди ФГК (*шунт Раппопорта*).

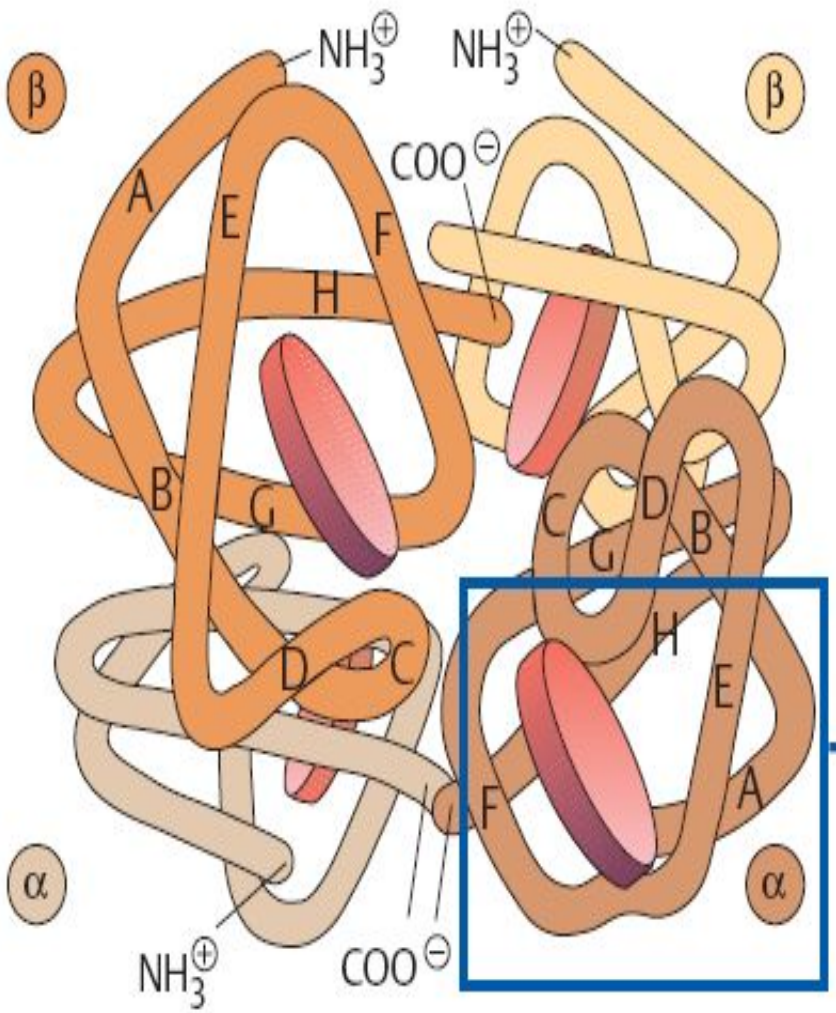
Особенности метаболизма Э (шунт Раппопорта)



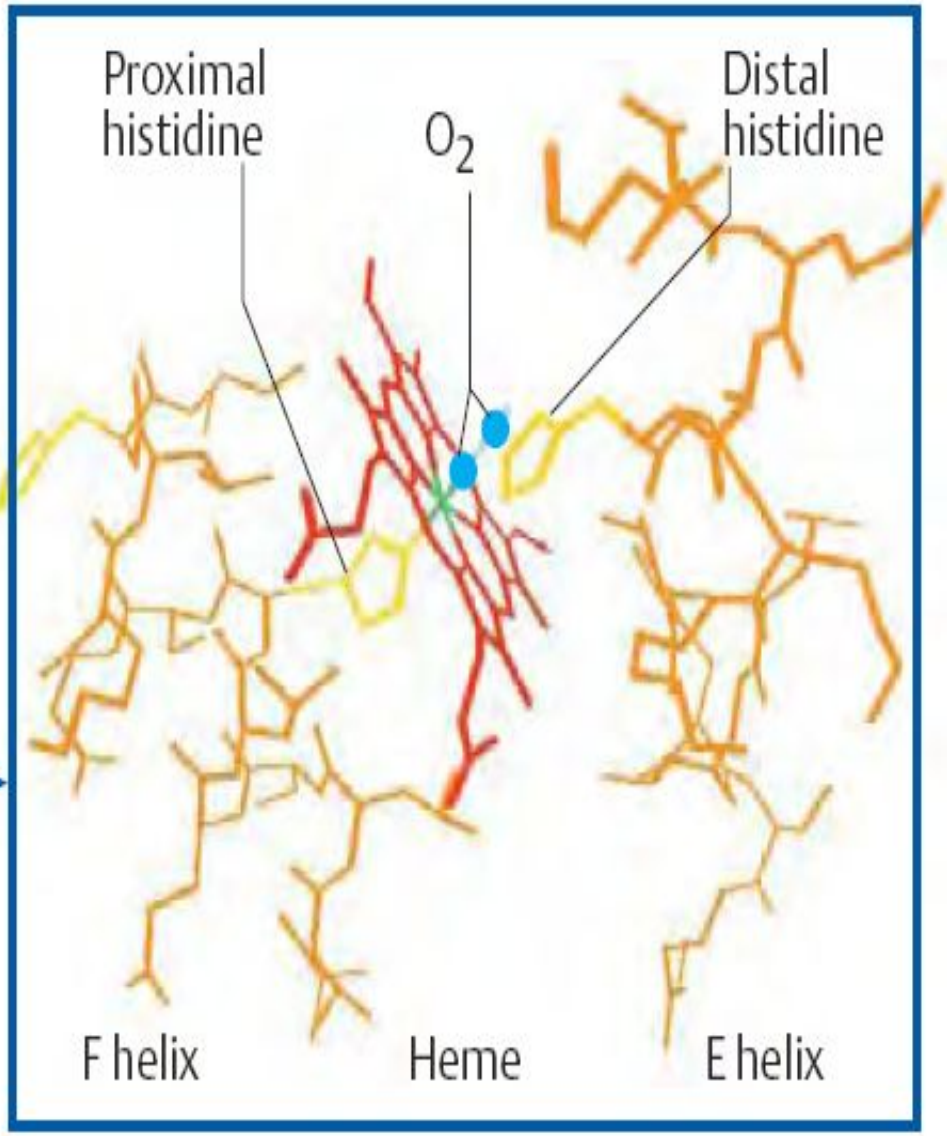
Мет Hb редуктазная система Э



A. Hemoglobin: structure



Hemoglobin A $(\alpha_2 \beta_2)$ M: 65 kDa



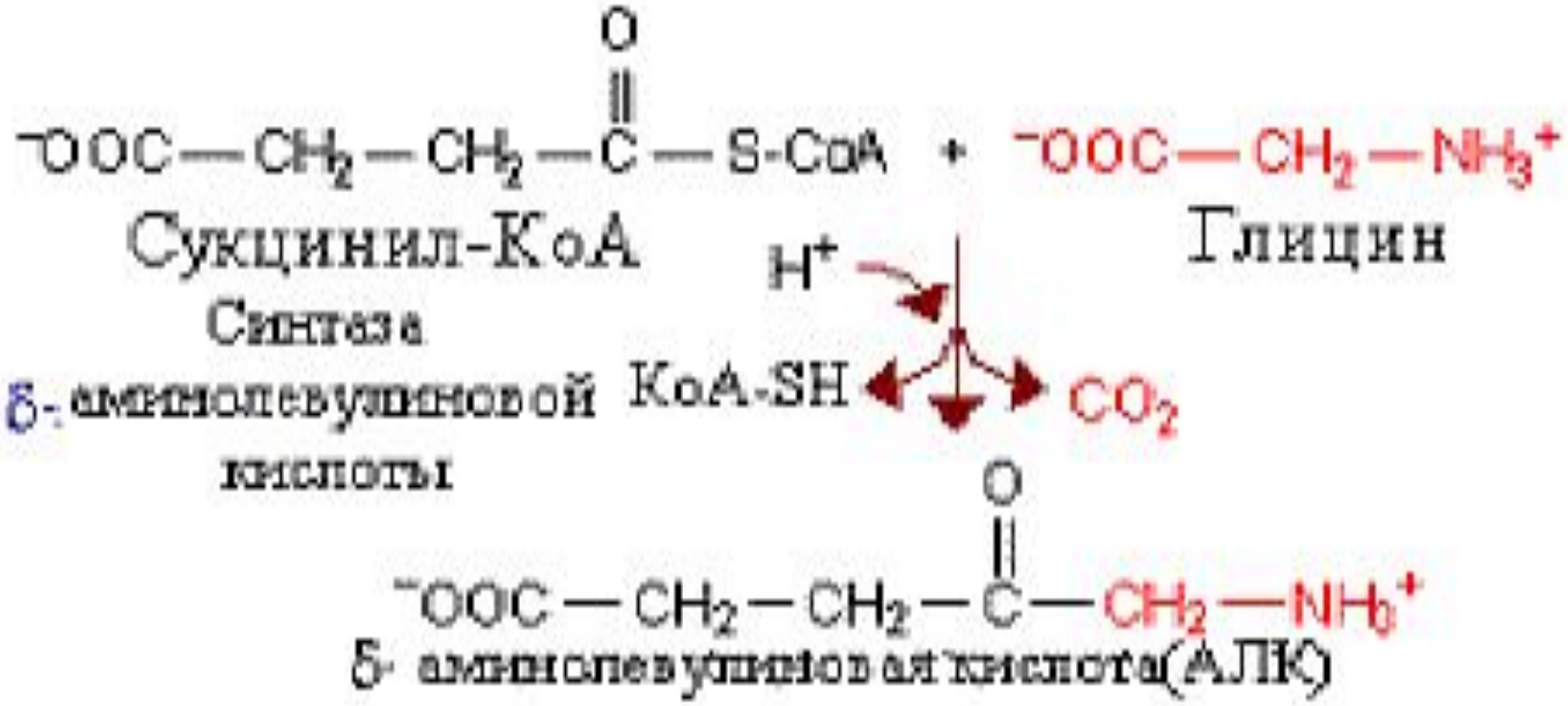
Синтез порфобилиногена и гема

- Первая реакция б/с гема происходит в Мх и происходит путем конденсации гли и сукцинил-КоА при участии пиридоксаль-фосфат содержащего фермента – синтазы ***d-аминолевулиновой кислоты (дАЛК).***

Эта реакция регуляторная и скорость-лимитирующая в б/с гема

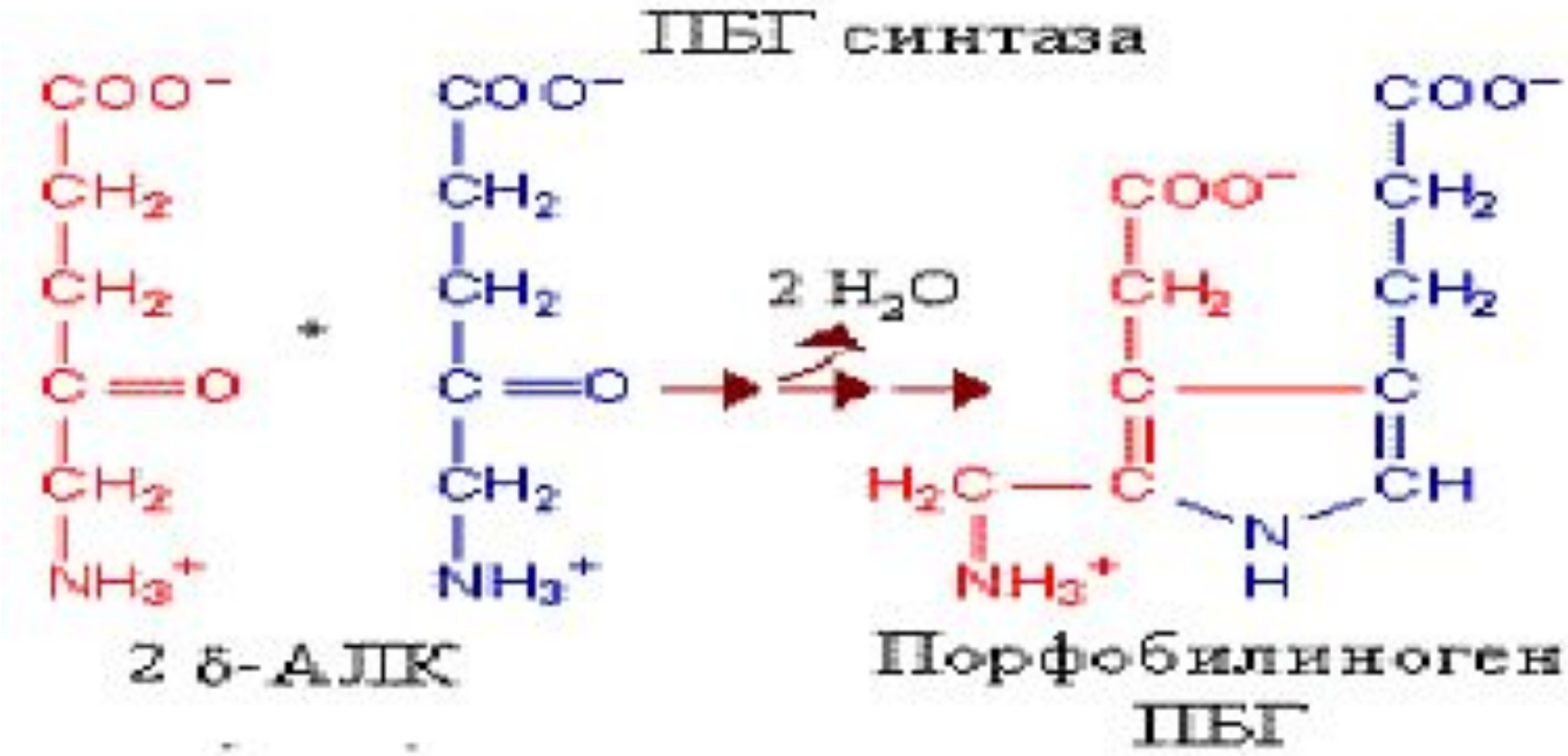
- Из Мх ***дАЛК*** транспортируется в цитозол, где ***дАЛК дегидратаза (синтаза порфобилиногена)*** димеризует 2 молекулы ***дАЛК*** с образованием пиррольного кольца порфобилиногена

Б/с гема (ΔАЛК) *в Мх*



Б/с гема (*порфобилиноген*)

в цитоплазме



Синтез гема (*прод*)

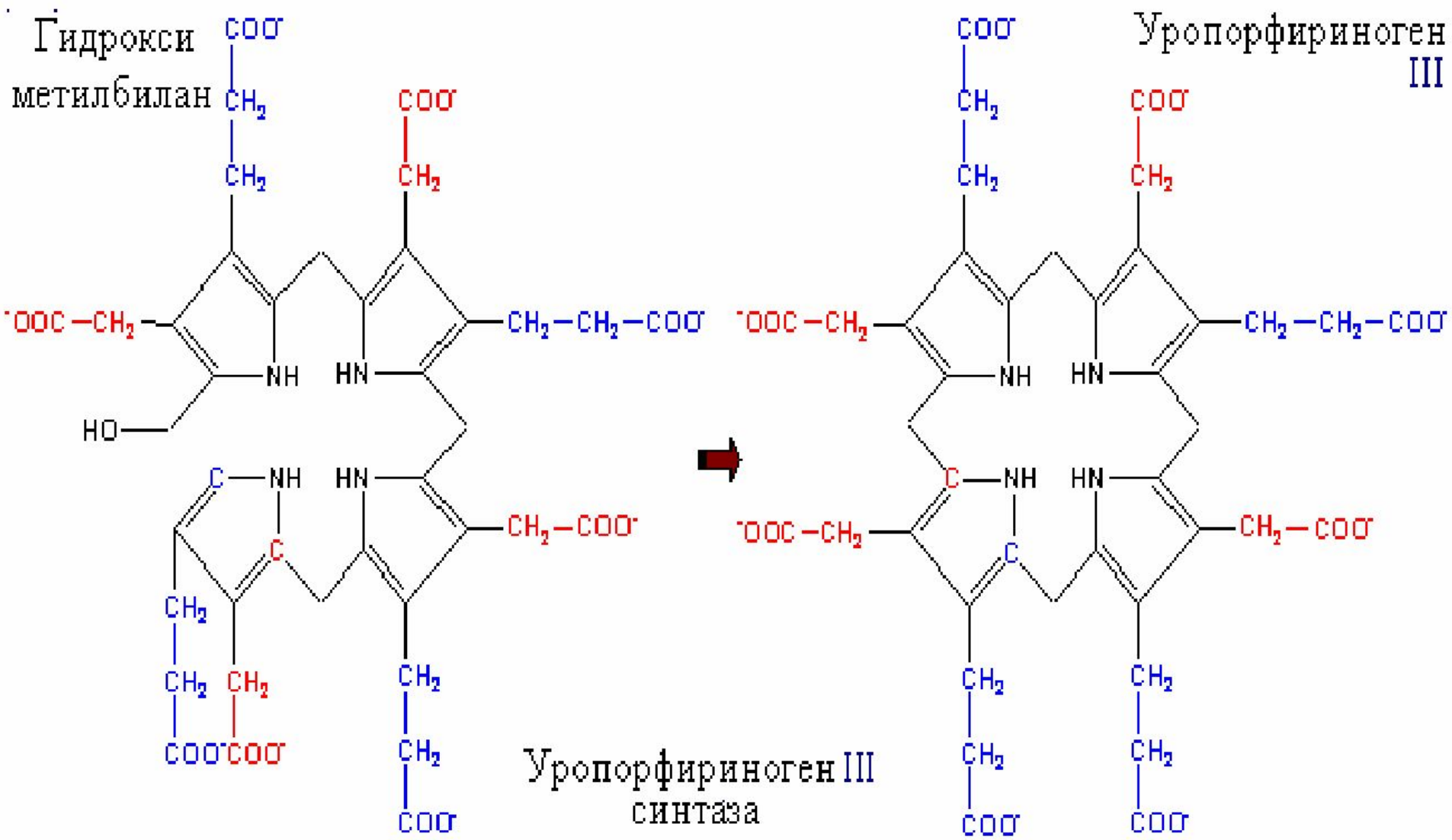
- Затем конденсация (голова-хвост) **4-х** молекул порфобилиногена с образованием линейного тетрапиррола –***оксиметилбилана***

(*фермент* ***порфобилиноген деаминаза*** (***уропорфирин I синтаза***)

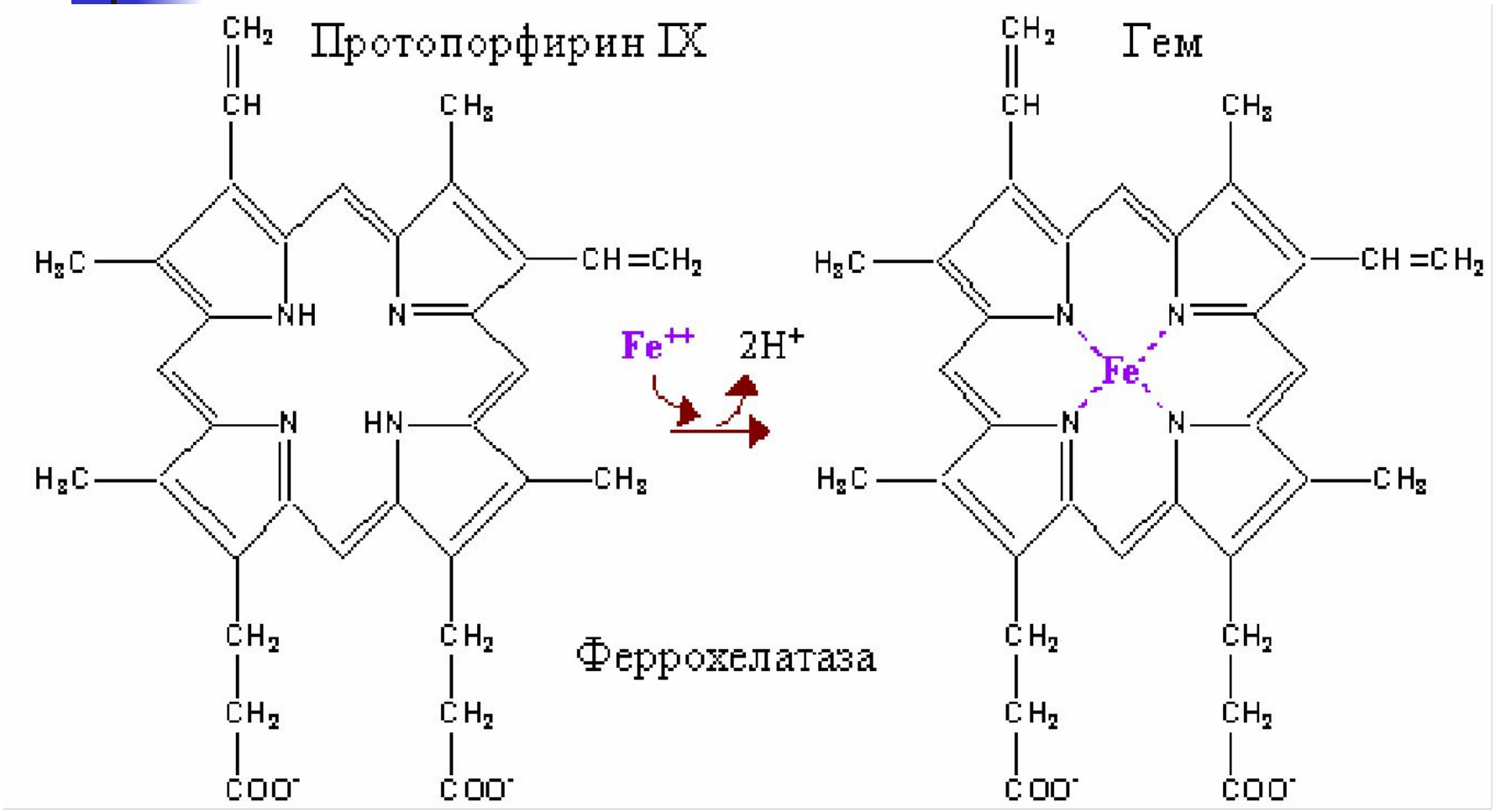
- ***Оксиметилбилан*** ⇒ ***Уропорфириноген III*** и далее **гем** ⇒

(*фермент* ***уропорфириноген синтаза***)

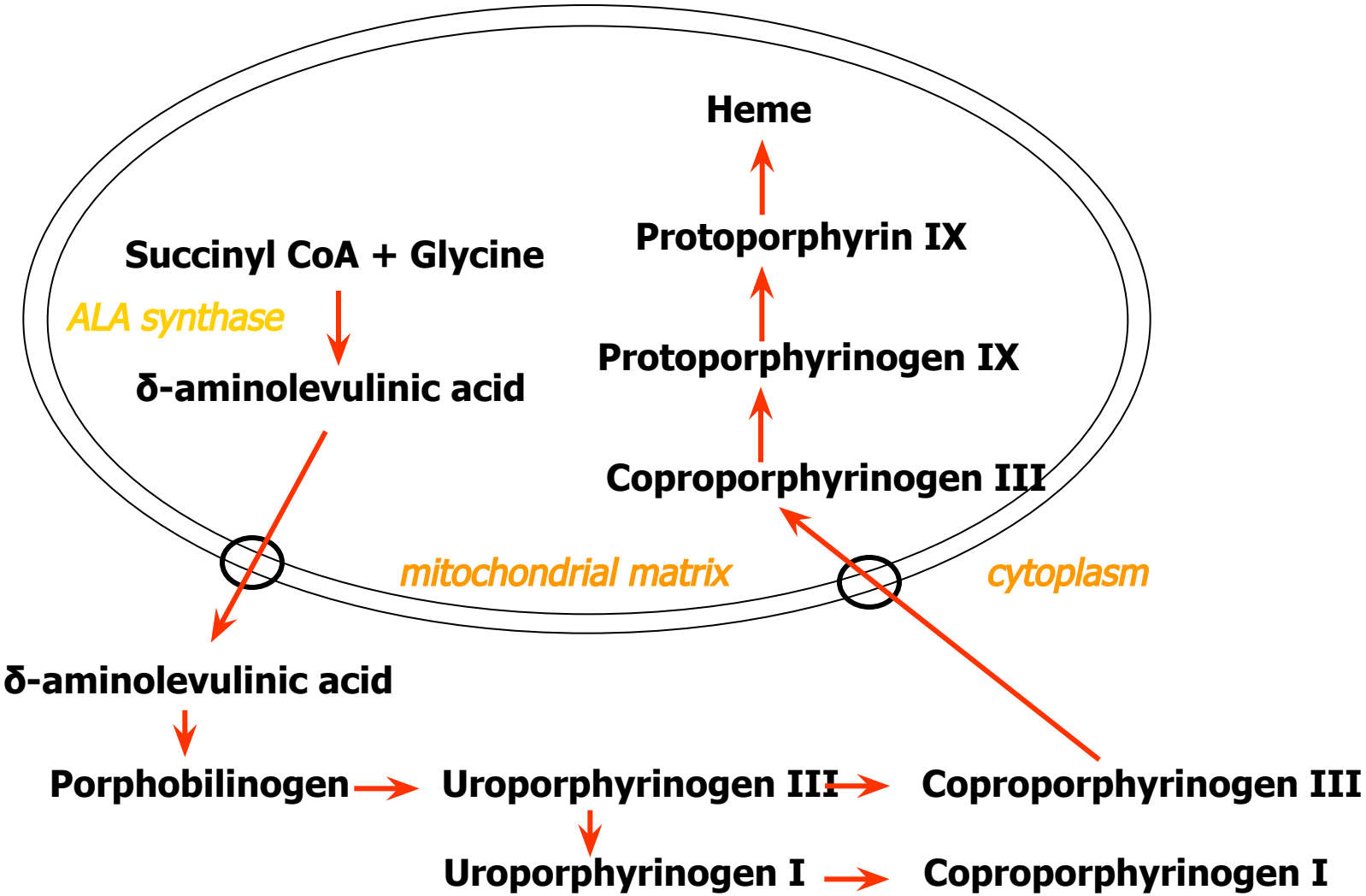
Б/с гема


Гидрокси метилбилан
Уропорфириноген III
Уропорфириноген III синтаза

Б/с гема (прод)

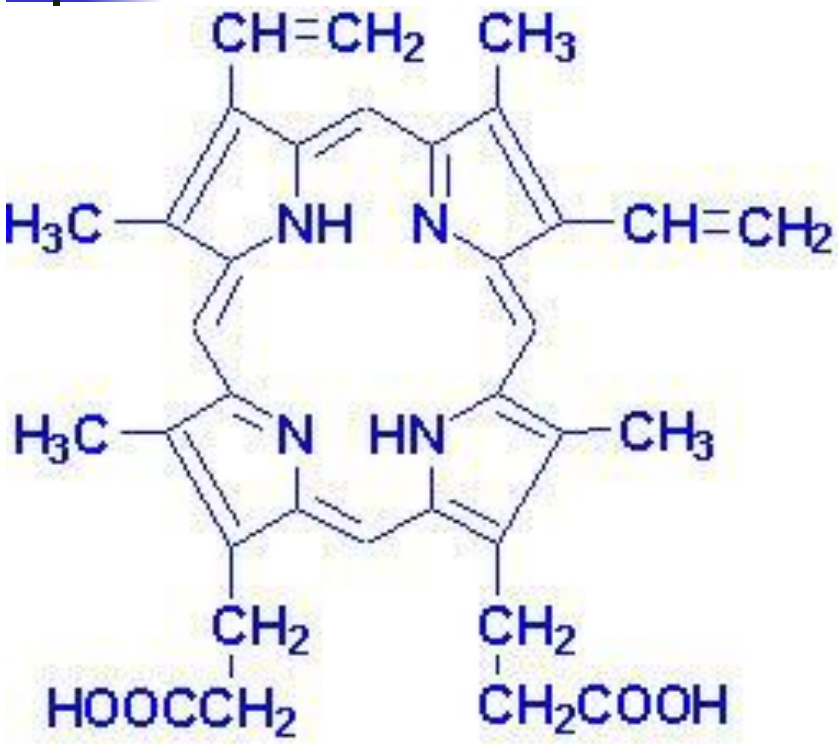


Overview of Heme Synthesis



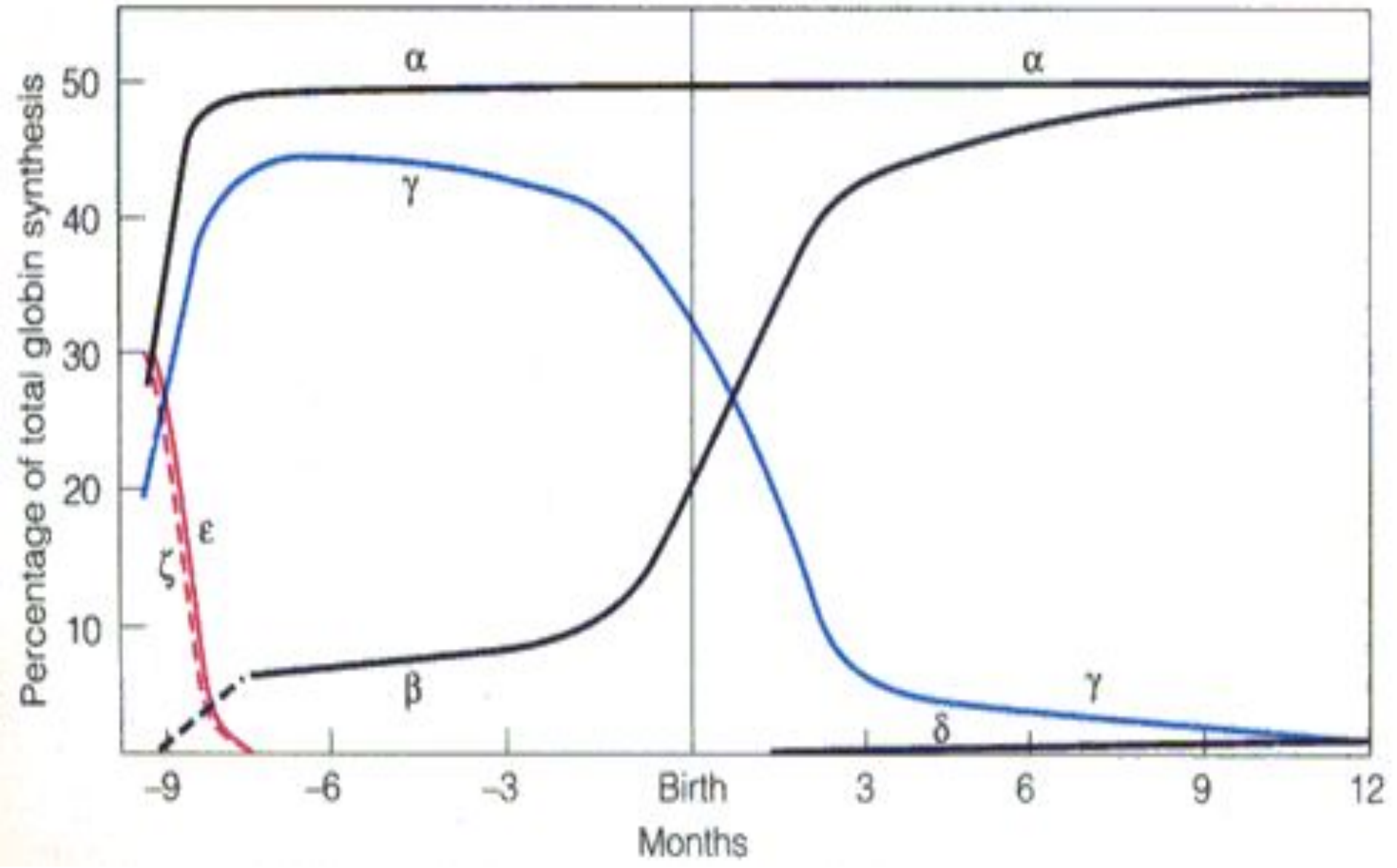
Heme synthesis occurs in all cells due to the requirement for heme as a prosthetic group on enzymes and electron transport chain. By weight, the major locations of heme synthesis are the liver and the erythroid progenitor cells of the bone marrow.

Протопорфирин и Pb

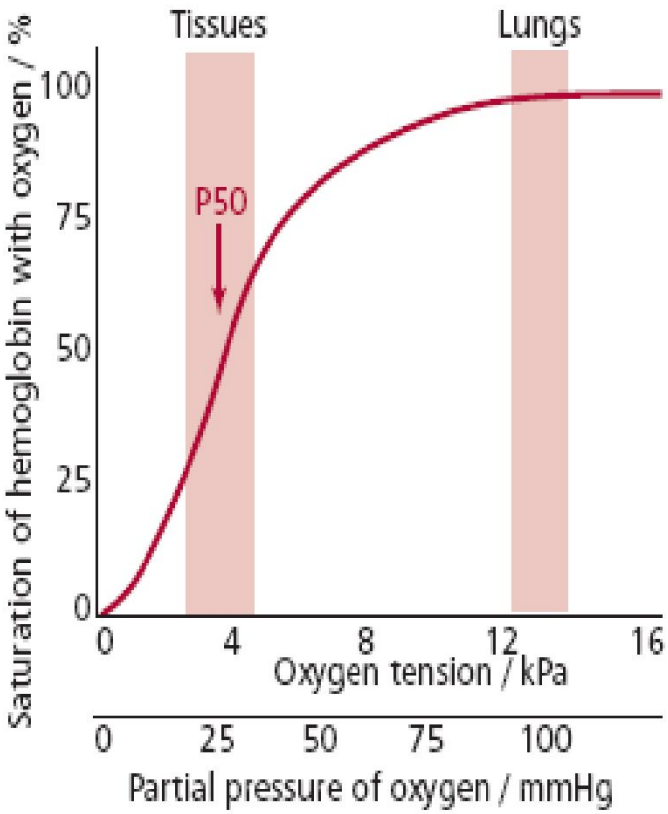


- SH-содержащие ферменты - *Феррохелатаза, синтаза дАЛК и дАЛК дегидратаза* высокочувствительны к действию тяжелых металлов
- Характерный признак для интоксикации Pb - возрастание в крови содержания дАЛК

Экспрессии субъединиц глобина



Кривая диссоциации HbO_2



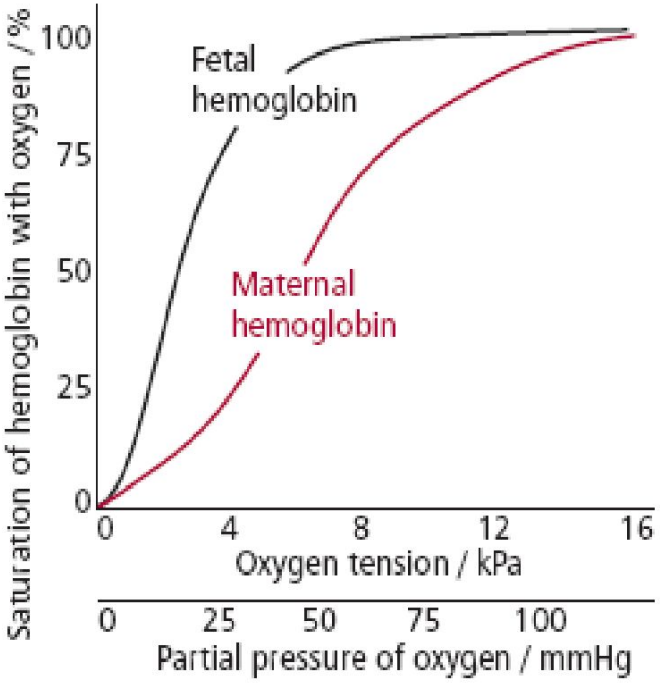


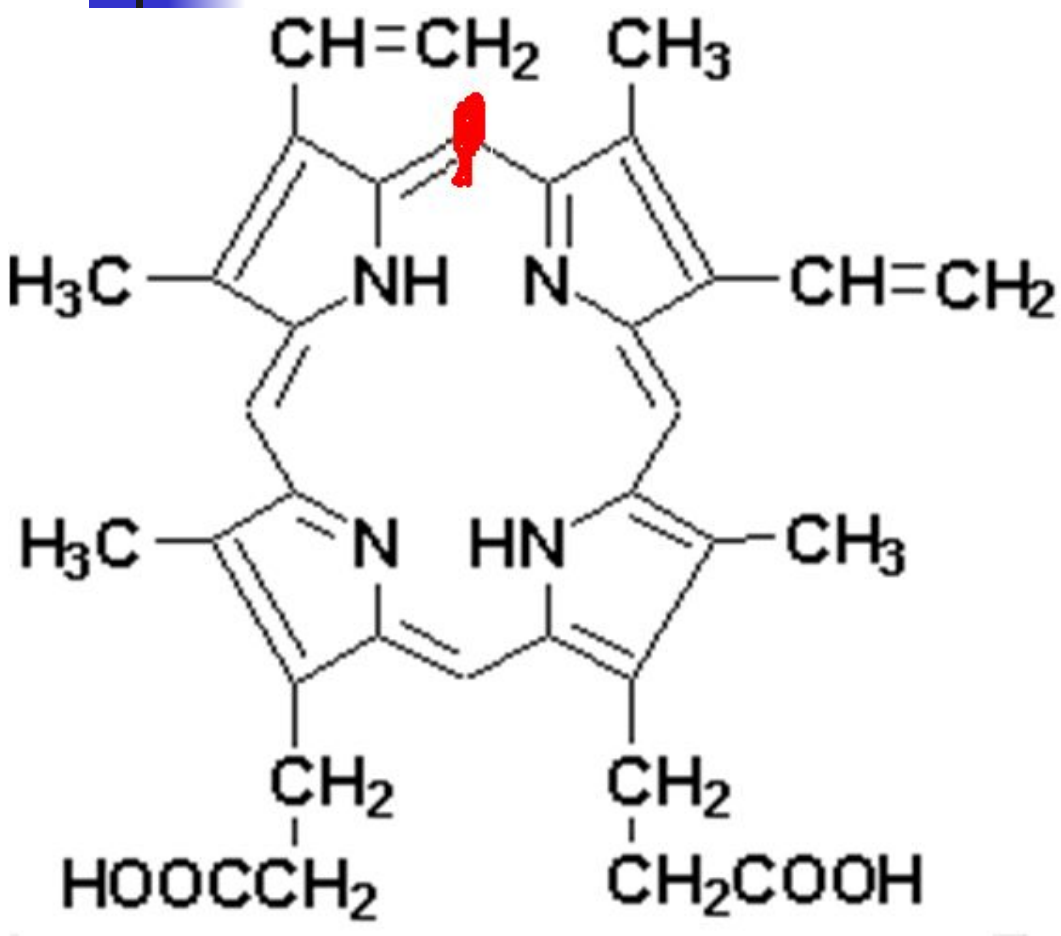
Figure 13.8 Graph showing that fetal hemoglobin has a higher affinity for oxygen than adult, maternal hemoglobin. This allows the fetus to obtain oxygen from the maternal blood.

Распад гема

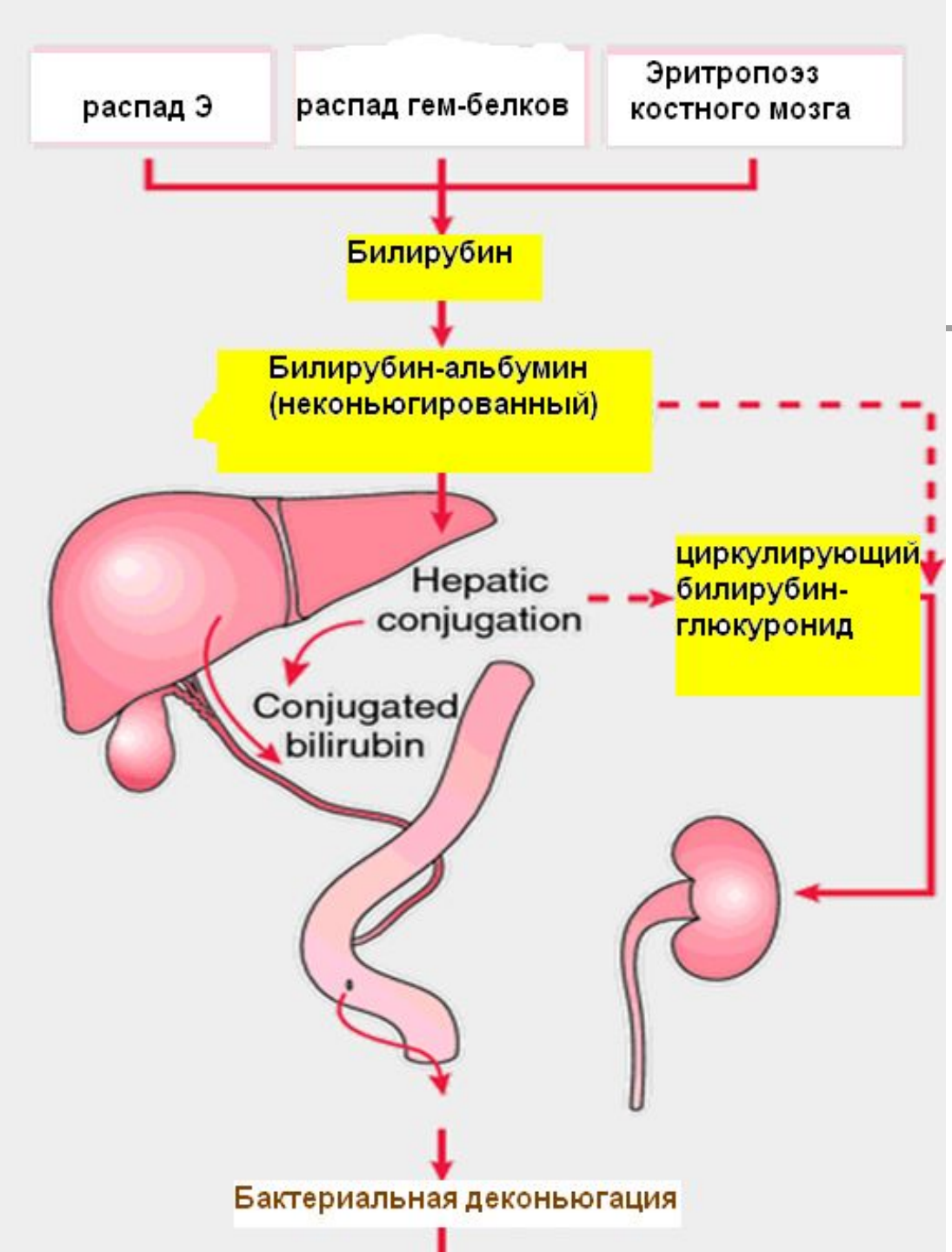
- Ежедневный оборот **Hb ~6 г/день.**
- Сроки жизни **Э ~**120 дней определяет система **АОЗ**, при снижении ее активности возрастает конц. **MetHb** активирующего в **Э** *пероксидный стресс и гемолиз*

- ***Гем*** старых **Э**, *цитохромов и др. гем-содержащих ферментов* освобождаются в РЭС.
  - Глобин деградирует и АК реутилизируются
  - **Fe^{3+}** реутилизируется

Распад гема



- Гем окисляется в ЭПС ***гем оксигеназой*** с разрывом цикла и образованием линейного тетрапиррола – ***биливердина***, выделения **Fe^{3+}** и **CO**.
- **CO** выделяется легкими и его количество отражает активность ***гем оксигеназы*** I.



Распад гема

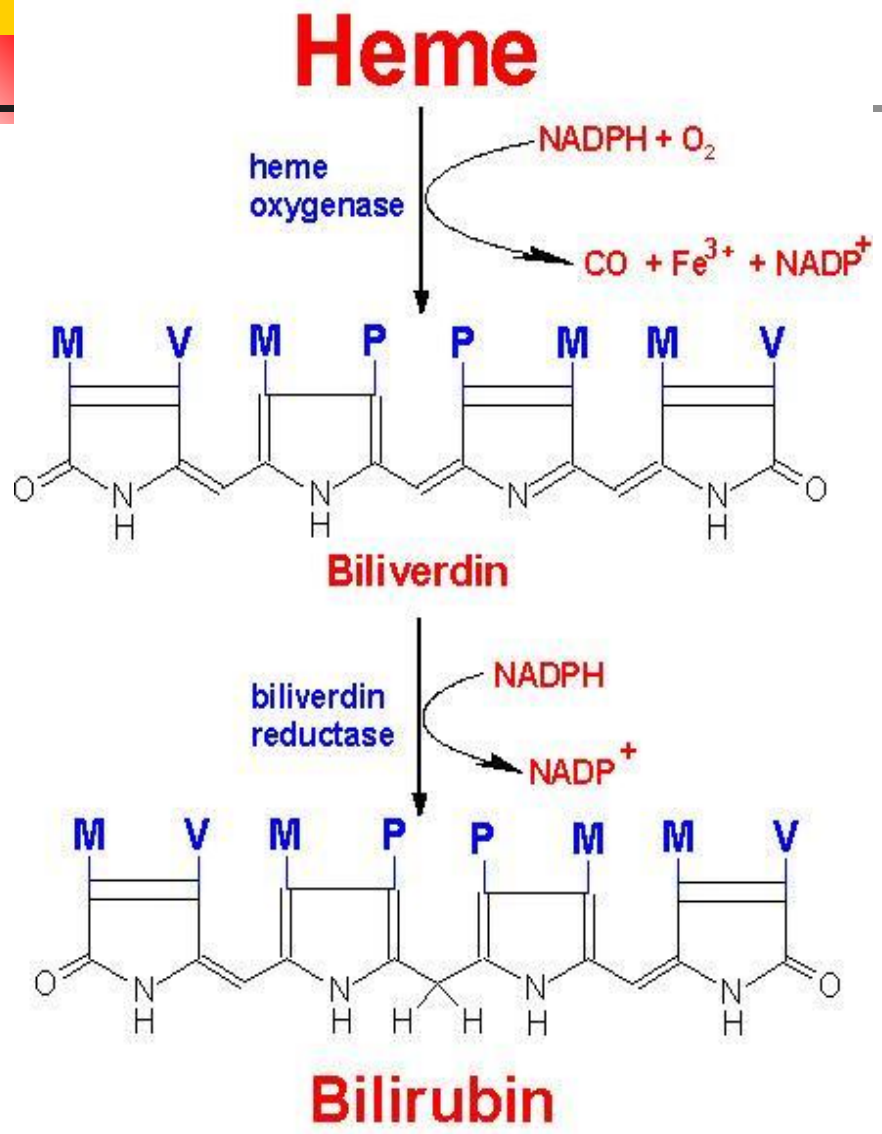
Источники гема:

- Hb эритроцитов
- Гем-протеиды (*миоглобин, каталаза, цитохромы ДЦ и др*)
- Гем-протеиды пищи

Образование билирубина

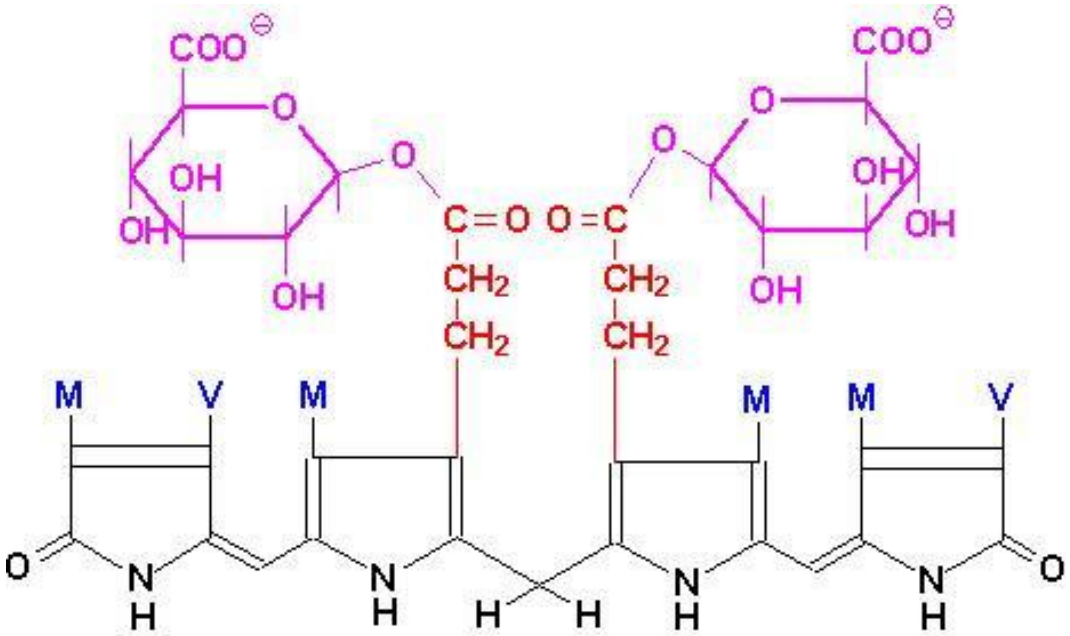
- Следующий этап CH_2 мост (между кольцами III и IV) ***биливердина*** восстанавливается ***биливердин редуктазой*** до ***билирубина,*** с соответствующим изменением цвета
  - Деградация гема отражается при прогрессирующем «цветении» гематом-синяков **темно-синий** →**красно-желтый** → **желтый**.
  - ***Билирубин*** гидрофобен поэтому транспортируется в виде комплекса с альбумином в печень, где подвергается дальнейшей деградации путем коньюгации с глюкуронидами.

Деградация гема

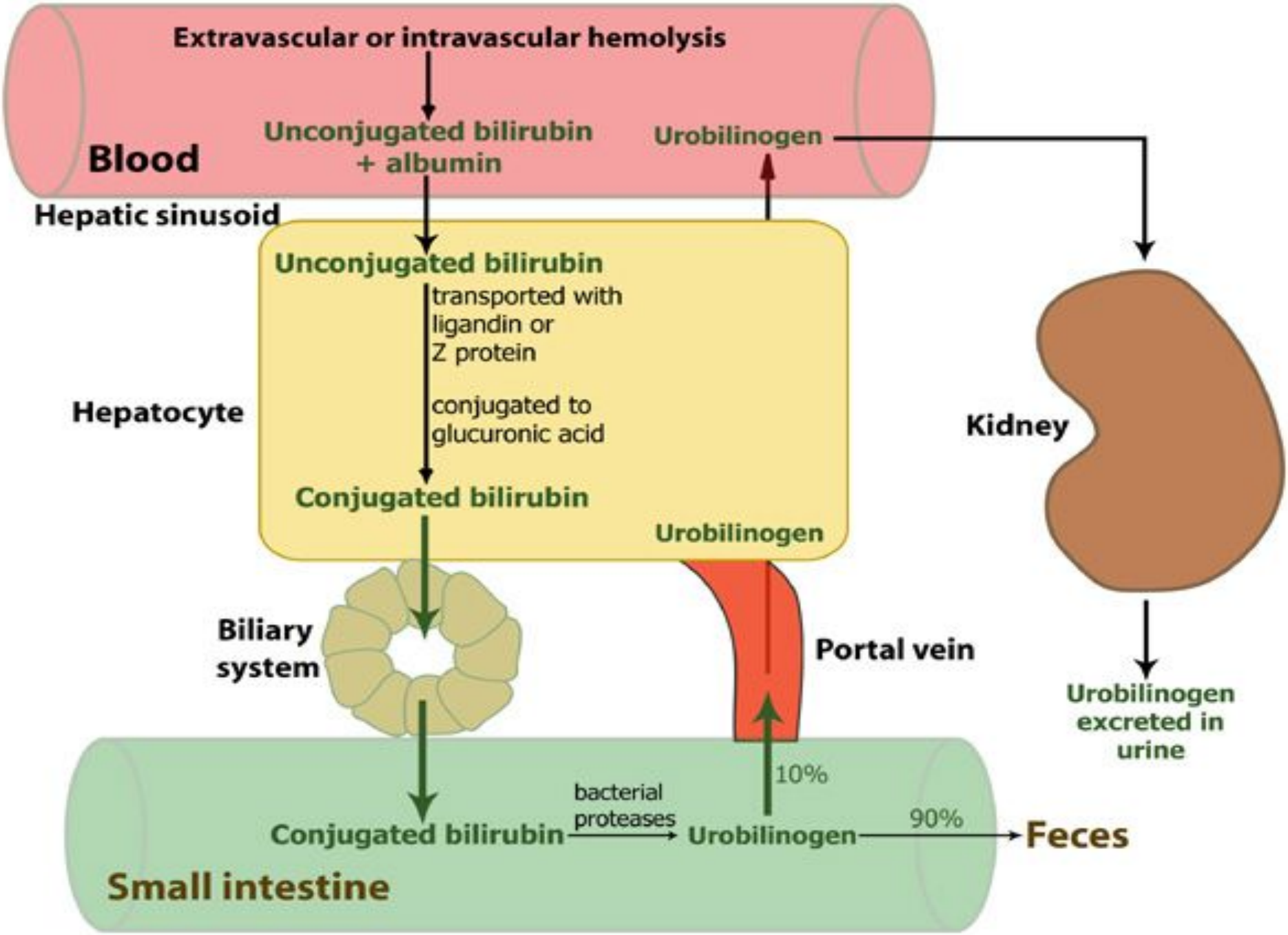


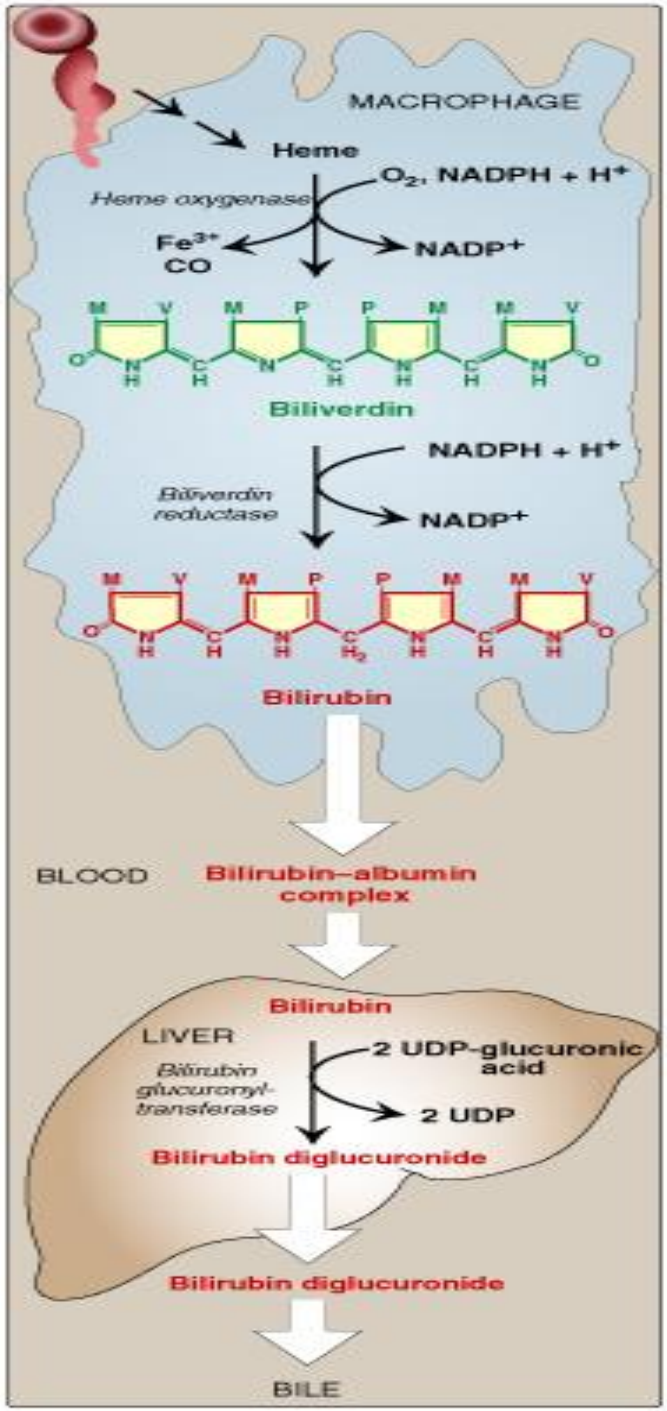
- **M= Метил, P=Пропионил V=Винил**

Билирубин-диглюкуронид



- В гепатоцитах **УДФ-глюкуронил трансфераза** присоединяет 2 остатка ГК к **билирубину** с образованием гидрофильного **билирубина-диглюкуронида,** что облегчает его экскрецию.
- **Билирубин и его** метаболиты называются желчными пигментами.


Extravascular or intravascular hemolysis
Blood
Unconjugated bilirubin
+ albumin
Urobilinogen
Hepatic sinusoid
Unconjugated bilirubin
transported with
ligandin or
Z protein
conjugated to
glucuronic acid
Hepatocyte
Conjugated bilirubin
Urobilinogen
Kidney
Biliary
system
Portal vein
Urobilinogen
excreted in
urine
10%
bacterial
proteases
90%
Conjugated bilirubin
Urobilinogen
Feces
Small intestine



Most heme from RBCs (85%) - rest from turnover of cytochromes, p450s, immature erythrocytes.

RBCs last 120 days, degraded by reticuloendothelial system (RES) [liver and spleen].

Microsomal heme oxygenase hydroxylates methenyl bridge carbon and oxidizes Fe^{2+} to Fe^{3+}. Second reaction open ring and release methenyl carbon as CO.

The resulting biliverdin is poorly soluble due to ring stacking and aggregation.

Serum albumin carries bilirubin in circulation, ligandin in hepatocytes.

Клинические аспекты метаболизма гема

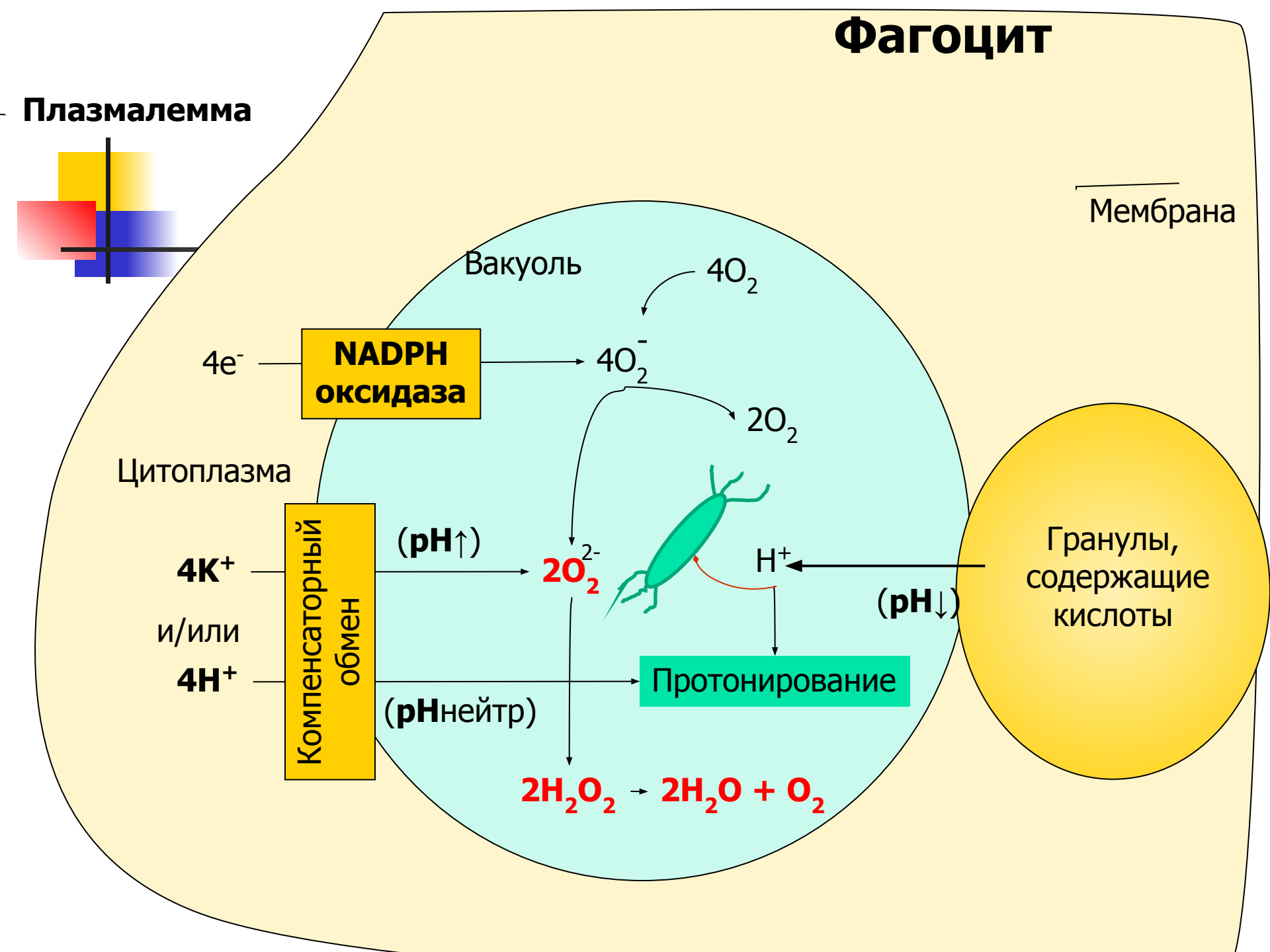
- представлены в виде:
  - Дефектов ферментов и нарушения б/с гема – **порфирий**, которые сопровождаются увеличением содержания в крови и моче интермедиатов б/с гема .
  - Врожденные и приобретенные нарушения метаболизма и экскреции билирубина – гипербилирубинемии (желтухи).

Желтухи

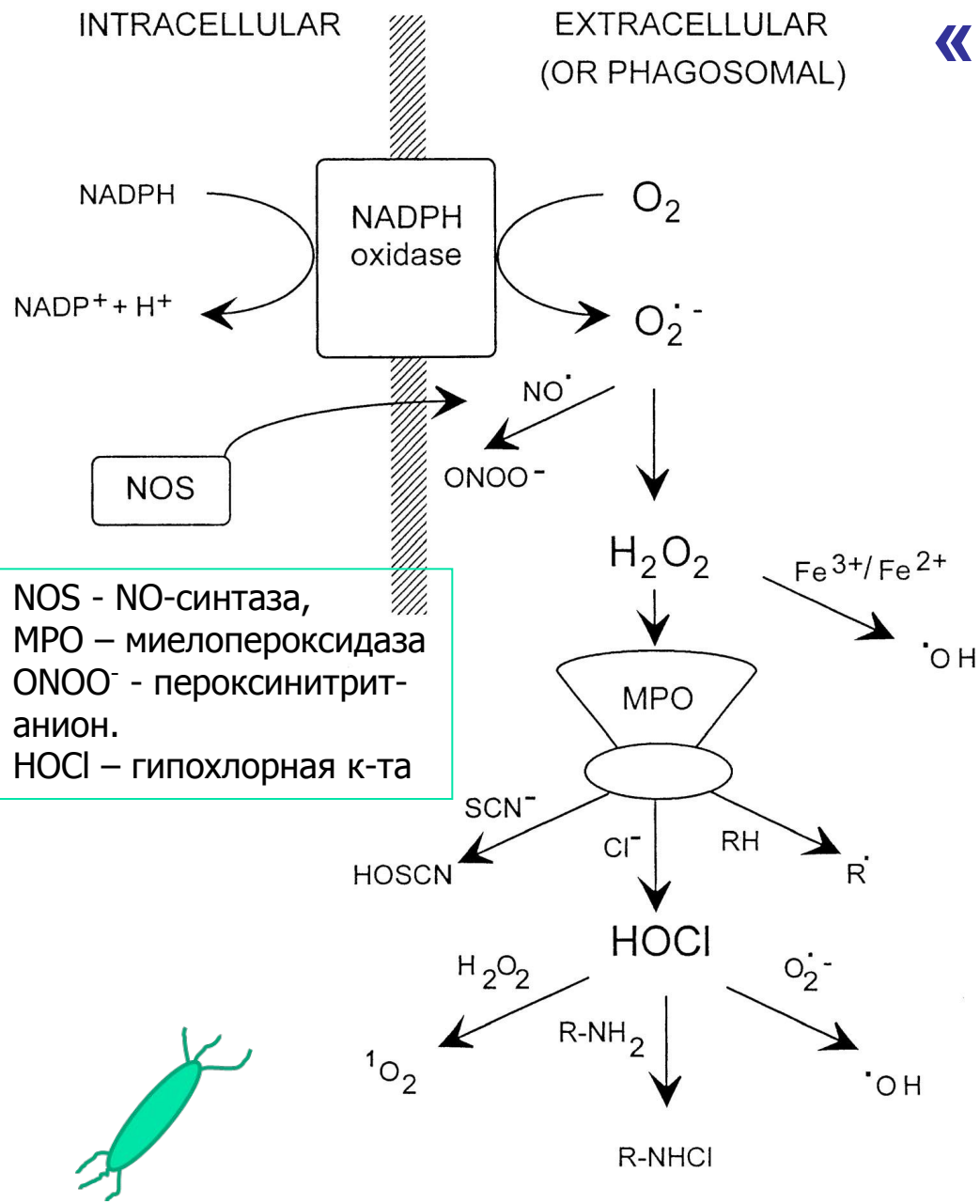
- Гипербилирубинемия проявляется в виде желтух – желтой пигментации кожи и слизистых.
- В норме в кишечнике билирубин при участии бактерий превращается в **уробилиноген** (**мезобилиноген**), который выделяется с фекалиями.
- Билирубин и продукты его катаболизма называются желчными пигментами.

Нейтрофилы (гранулоциты) – полиморфноядерные лейкоциты:

- обладают выраженной способностью к фагоцитозу,
- Хорошо развитый, подвижный цитоскелет,
- Активное Мх и Мс - окисление
- Систему продукции NADPH (*ПФП и др.*)
- Систему генерации АФК
- Богаты гранулами (*определяющие название*), в состав которых входят гидролазы - протеазы: *эластаза, коллагеназа или катепсин G* и гликозидазы: *лизоцим* (*мураминидаза*), лизирующие бактерии


Фагоцит
Плазмалемма
Мембрана
Вакуоль
$4O_2$
$4e^-$
NADPH оксидаза
$4O_2^-$
$2O_2$
Цитоплазма
$4K^+$
и/или
$4H^+$
Компенсаторный обмен
(pH↑)
$2O_2^{2-}$
H^+
(pH↓)
Гранулы, содержащие кислоты
Протонирование
(pHнейтр)
$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

«Кислородный взрыв» и генерация АФК

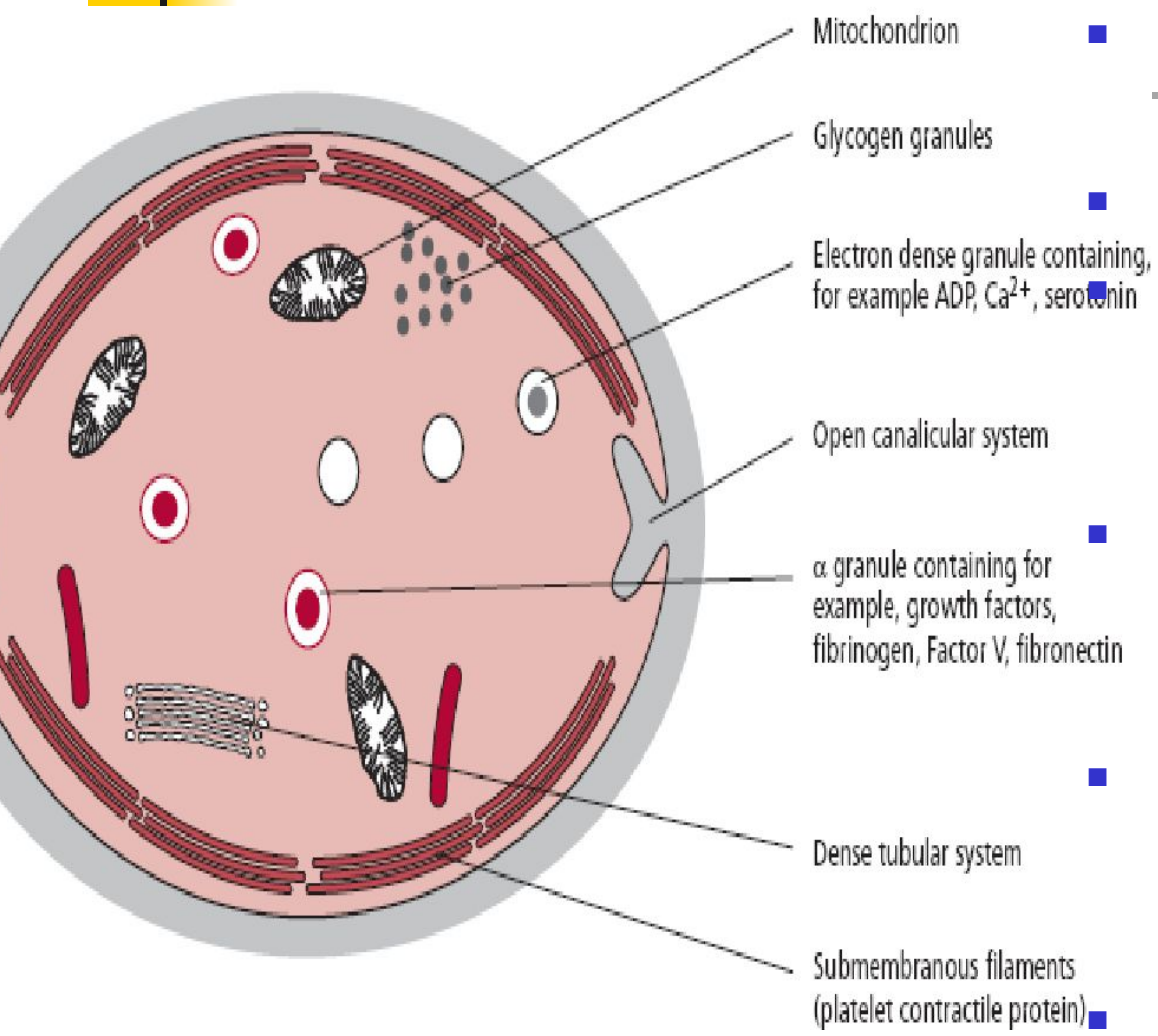


NOS - NO-синтаза,
MPO – миелопероксидаза
$ONOO^-$ - пероксинитрит-анион.
HOCl – гипохлорная к-та

Hampton M B et al. Blood 1998;92:3007-3017

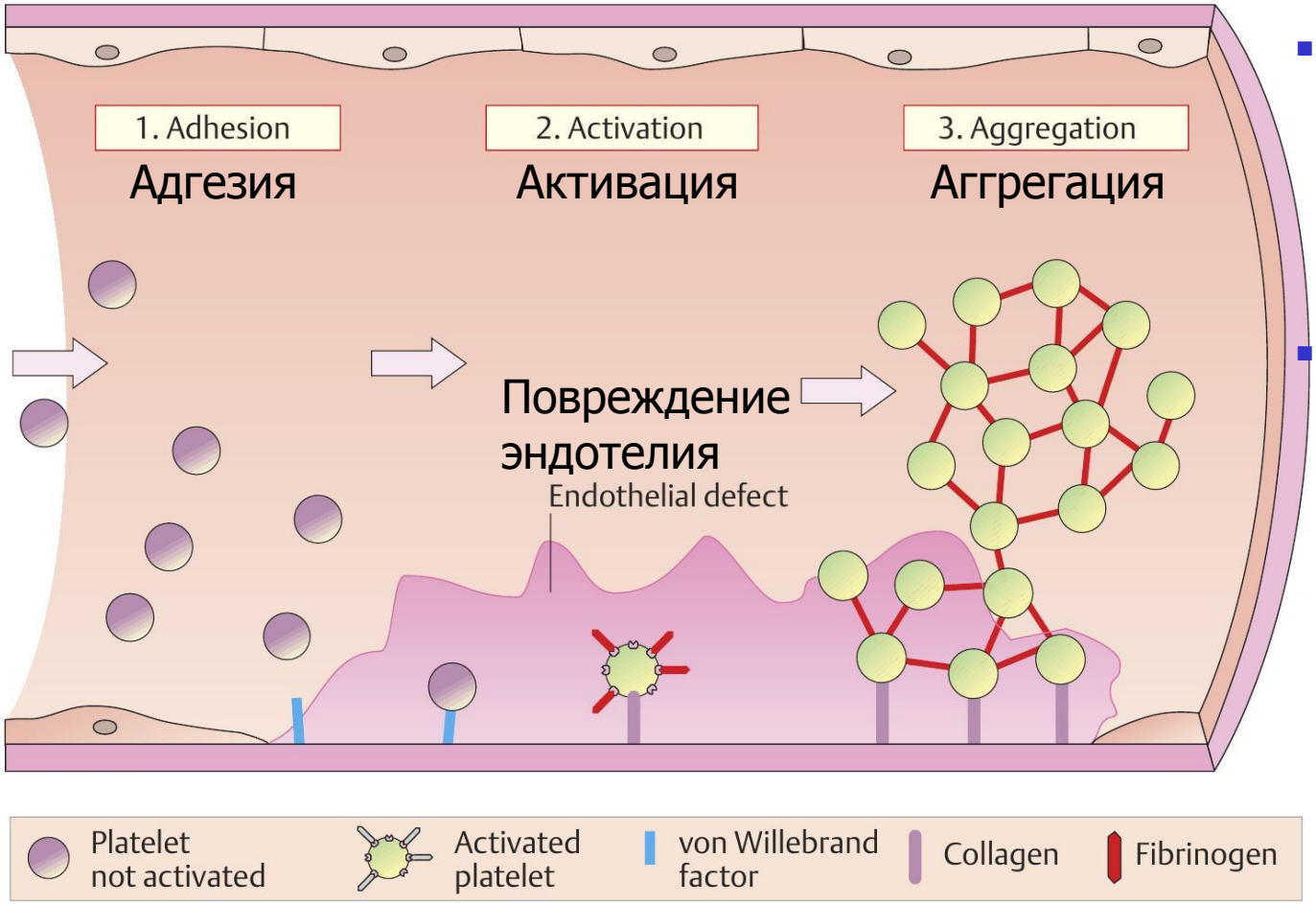
- В течение минуты после фагоцитоза резко возрастает потребление O_2 нейтрофилом «*кислородный взрыв*»
- Образующиеся при этом **АФК** обладают выраженным бактерицидным действием.

Структура тромбоцита



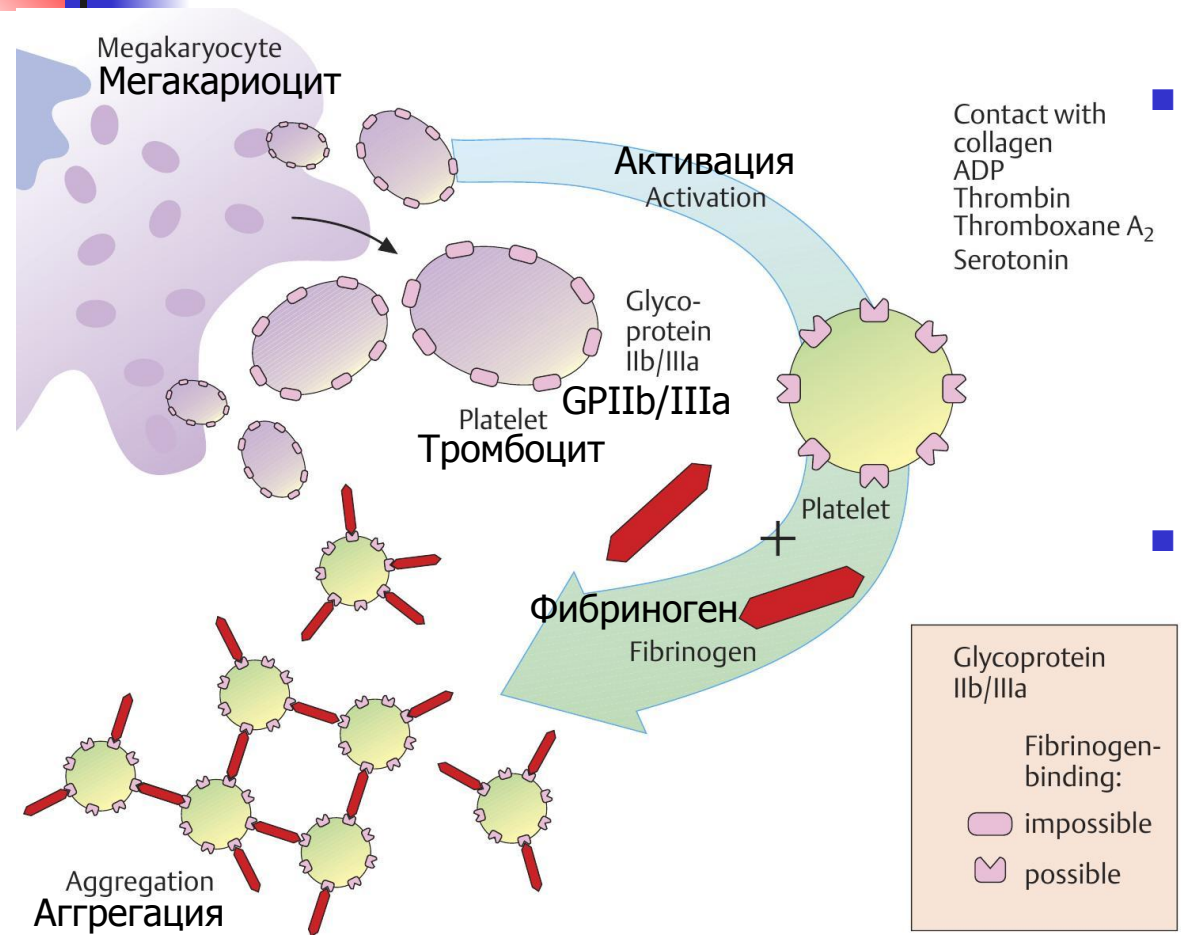
- Тромбоцит имеет Мх (ЦТК, β-окисление ЖК, ДЦ).
- Депо гликогена.
- Субмембранные сократительные филаменты.
- Электроноплотные гранулы содержащие АДФ, Ca^{2+}, серотонин.
- Гранулы содержащие ФР, фибриноген, фибронектин, фактор V
- Ионные каналы.

Тромбогенез



- Под слоем эндотелия находится коллаген с факторами фон Виллебранда.
- Связывание с ними вызывает активацию тромбоцитов.

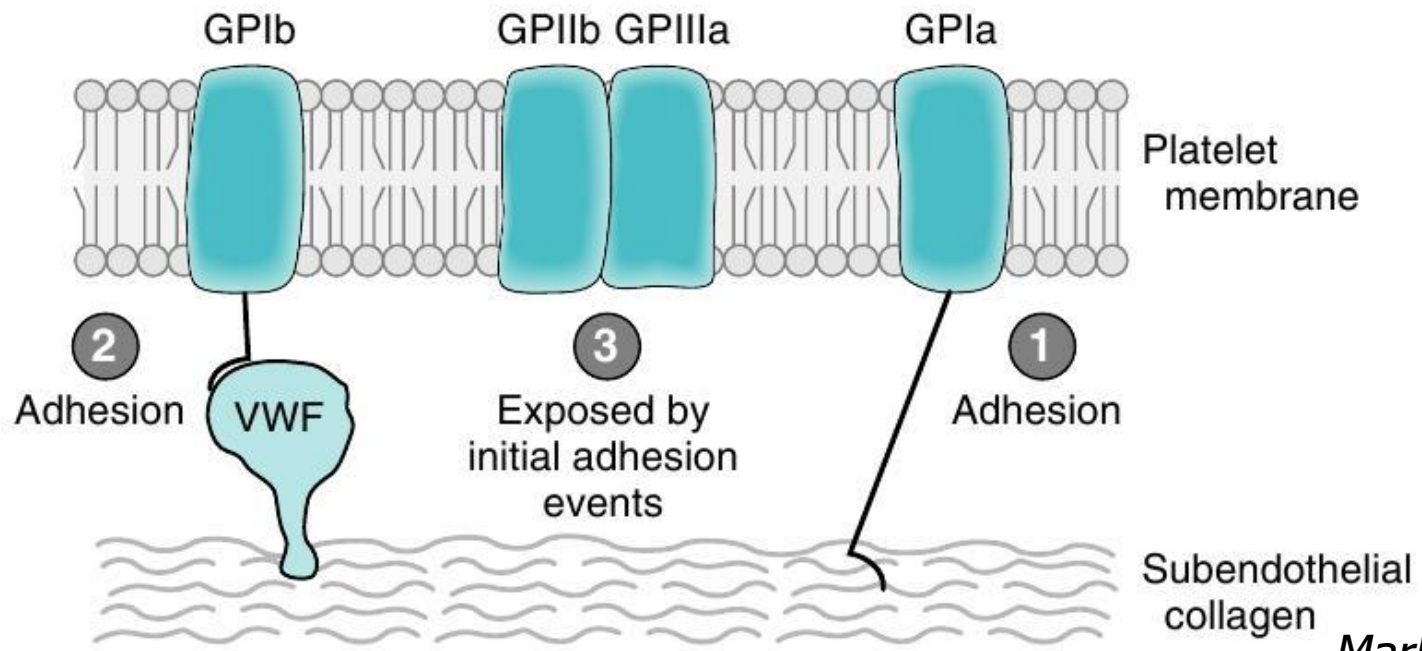
Аггрегация тромбоцитов с помощью интегринов GPIIb/IIIa



- Активация тромбоцитов – способность связываться с фибриногеном.
- Активаторы – коллаген, АДФ, тромбин, тромбоксан A_2, серотонин.

Адгезия тромбоцитов. Механизм активации

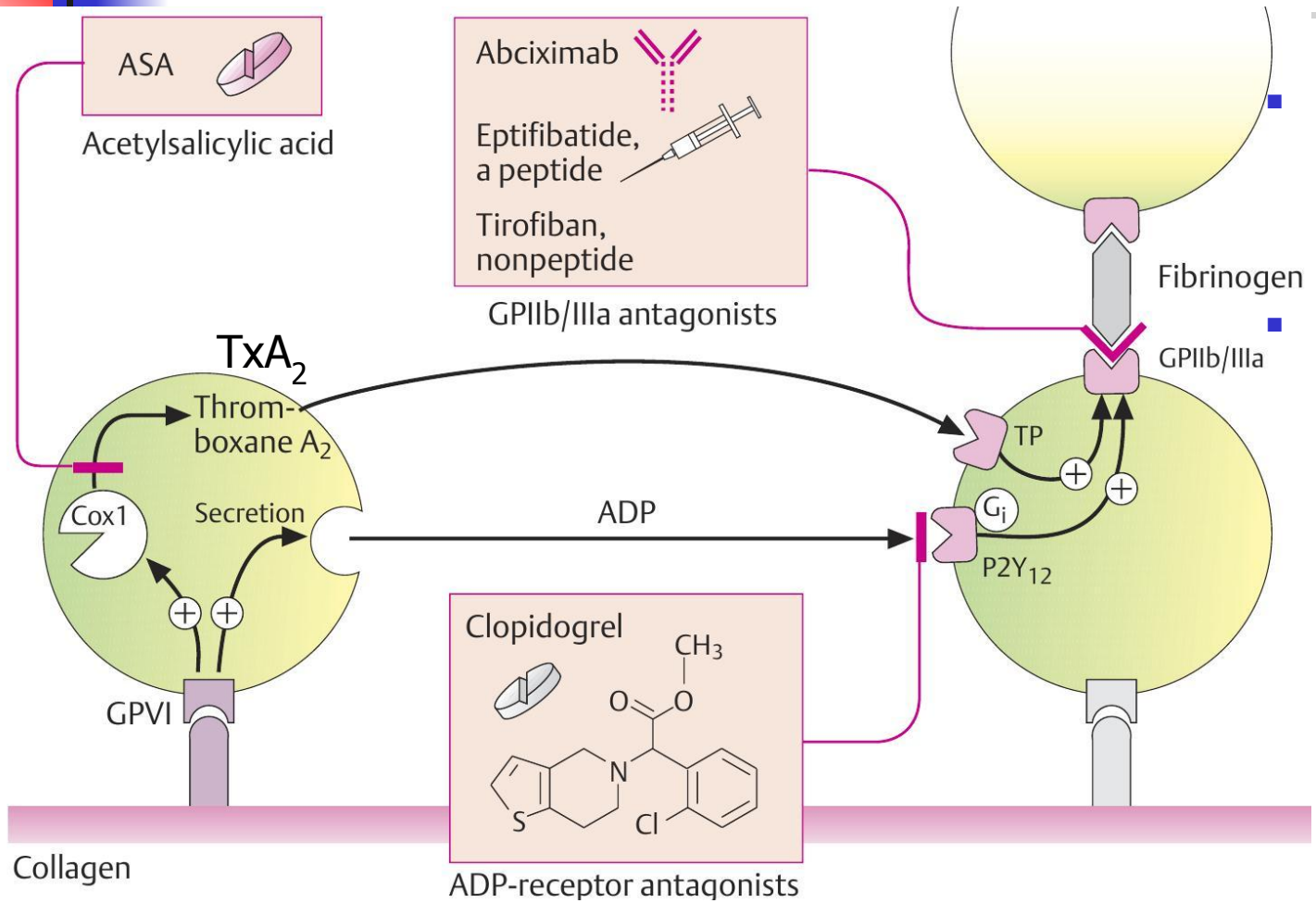
GP – гликопротеин



Marks, 2005

1. Связывание GPIa с коллагеном субэндотелиального слоя.
2. Связывание GPIb с ф. фон Виллебранда (vWF).
3. Экспонированный комплекс GPIIb/GPIIIa затем связывается с vWF и **фибриногеном**.

Регуляция аггрегации тромбоцитов. Ингибиторы



- Активация тромбоцитов и секреция TxA_2 и АДФ.
- Ингибируют аггрегацию ацетилсалицилловая кислота и ряд др. в-в.

Патология

- Синдром Бернара-Сулье (GP1b)

Болезнь Виллебранда (vWF)

Заключение

- Защитные функции крови обеспечиваются лейкоцитами (нейтрофилами) и тромбоцитами.
- Ферментативные процессы лежат в основе всех процессов.

Спасибо за внимание!