

Jacek Golański, Cezary Watała

**MECHANIZMY MOLEKULARNE PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU
AKTYWACJI PRZEZ WYBRANE RECEPTORY BŁONOWE
PŁYTEK KRWI***

Praca omawia molekularne mechanizmy uruchamiania sygnału aktywacji w płytkach przy udziale różnych systemów receptorowych płytek oraz rolę różnych agonistów w aktywacji płytek. Autorzy przedstawiają schematy fizjologicznych torów aktywacji oraz hamowania aktywacji w płytkach krwi. Szczególną uwagę zwrócono na znaczenie zmian konformacyjnych glikoprotein płytkowych, reorganizacji cytoszkieletu błony, mobilizacji jonów wapniowych, procesów fosforylacji i defosforylacji mediatorów aktywacji oraz płynności dwuwarstwy lipidowej w procesach aktywacji krwinek płytkowych.

Krwinki płytkowe są najmniejszymi, beźdrzastymi elementami morfotycznymi (średnica 2–4 μm , objętość 5–7,5 μm^3). Powstają one z rozpadu cytoplazmy megakariocytów w szpiku i częściowo w płucach. Liczba płytek u osób zdrowych wynosi 150–400 $\times 10^9/\text{l}$, około 30% płytek znajduje się w puli śledzionowej. Czas życia płytek w krążeniu wynosi około 8–12 dni, po tym czasie ulegają one fagocytozie, głównie w śledzionie. Niepobudzona płytka ma dyskoidalny kształt i charakterystyczny układ ziarnistości. Otoczona jest błoną cytoplazmatyczną, w której zlokalizowane są liczne glikoproteiny receptorowe (GP) sprzężone z enzymatycznymi systemami przetwarzania sygnałów transdukcyjnych. Z błoną połączony jest także rozbudowany system kanalików. Kształt płytek krwi utrzymywany jest przez cytoszkielet płytkowy złożony w przeważającej części z aktyny (15–30% białka płytek) i miozyny [3, 15, 45, 58, 87]

Pobudzenie płytek powoduje reorganizację cytoszkieletu, a co za tym idzie zmianę kształtu (formują się nibynóżki), co ułatwia kontakt z podścieliskiem i z sąsiednimi płytkami. W dalszych etapach aktywacji następuje

* Praca finansowana z projektu KBN 4P05A 071 12.

przesunięcie ziarnistości oraz reakcja uwalniania ich zawartości na zewnątrz płytek [8, 17, 75, 97]. Z ziarnistości α wydostają się białka swoiste dla płytek, takie jak np. czynnik płytkowy 4 i β -tromboglobulina, białka adhezyjne, takie jak fibronektyna, czynnik von Willebranda, trombospodyna, witronektyna, białka czynne w krzepnięciu krwi i fibrynolizie, takie jak fibrynogen, czynnik V, wielkocząsteczkowy kininogen, czynnik XI, inhibitor C_1 esterazy, białko S, PAI-1, jak również czynniki o aktywności mitogennej (np. PGDF czy PDECGF). Z ziarnistości gęstych zostają uwolnione związki niskocząsteczkowe, takie jak nukleotydy, kationy dwuwartościowe (Ca^{2+} , Mg^{2+}), serotonina oraz fosfoinozytole, z lizosomów, głównie kwaśne hydrolazy, zaś z peroksysomów katalaza [45, 58, 76, 87]. Uruchomienie aktywacji wyzwała ich odpowiedź funkcjonalną, na którą składają się zmiany kształtu, adhezja, aktywacja systemów receptorowych, reakcja uwalniania oraz ostatecznie agregacja. Przemiany te związane są z uruchomieniem licznych szlaków biochemicznych, takich jak utlenianie kwasu arachidonowego, aktywacja fosfolipaz i hydroliza fosfolipidów błony komórkowej, inhibicja lub aktywacja układu cykazy adenylanowej oraz cykazy guanylowej, fosforylacja i defosforylacja kinaz białkowych, czy mobilizacja jonów Ca^{2+} w cytoplazmie płytki [8, 17, 45].

Te dynamiczne przemiany obejmują w równym stopniu wewnątrz komórki i molekularne szlaki przekazywania sygnału, jak i błonę komórkową: w ostatnim przypadku są to zmiany płynności matrycy lipidowej, zmiany konformacji białek błonowych oraz zmiany na powierzchni błony, na której dochodzi do uaktywnienia receptorów i odsłonięcia fosfolipidów czynnych w procesie krzepnięcia [8, 58, 96]. Prokoagulacyjną aktywność posiadają ujemnie naładowane fosfolipidy: fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanolamina. Mechanizm ten, nazwany udostępnieniem czynnika tromboplastycznego płytek (PF-3), determinuje miejsce płytek w wewnątrzpochodnym szlaku aktywacji układu krzepnięcia [7, 58]. Kluczowe, z punktu widzenia hemostazy, jest oddziaływanie płytek ze śródbłonkiem i macierzą zewnątrzkomórkową. Śródbłonek działa przeciwzakrzepowo, jego powierzchnię wyściela glikokaliks złożony głównie z siarczanu heparanu, a do światła naczynia wydzielane są: białko C, białko S, prostacyklina, t-PA i tlenek azotu (NO). Z drugiej strony, komórki śródbłonka są miejscem syntezy: PAI-1, składnika C3 dopełniacza, PGDF, FGF, EDGF i vWF [42, 58, 97]. Subtelny mechanizm regulacji napięcia naczyń krwionośnych, wzrostu komórek, i adhezji ulega zakłóceniu na przykład w przypadku miażdżycy, w której uszkodzenie warstwy śródbłonka powoduje nadmierną – niewspółmierną do potrzeb prawidłowej hemostazy – adhezję płytek do warstwy podśródbłonkowej [27, 48, 57, 62, 114]. Dzięki receptorom błonowym płytki krwi przylegają do ściany naczynia (za pośrednictwem vWF, fibronektyny, lamininy, witronek-

tyny), uruchamiając kaskadę reakcji prowadzącą do powstania zakrzepu tętniczego [114].

Istotne, lecz nie do końca poznane, są oddziaływania płytek krwi z krwinkami białymi, a szczególnie z makrofagami, monocytami i granulocytami (PMNC) [35, 113]. Pobudzone PMNC uwalniają czynniki aktywujące płytki krwi, takie jak PAF, leukotrieny, tromboksany, cytokiny (IL-1, TNF), toksyczne metabolity tlenu oraz enzymy hydrolityczne [1, 37]. Szczególnie ważną rolę przypisuje się elastazie i katepsynie G. Enzymy te, wydzielane przez pobudzone granulocyty, hydrolizują czynniki krzepnięcia krwi, białka regulatorowe oraz glikoproteiny powierzchniowe błon płytek krwi, przez co mają znaczący wpływ na cały układ hemostazy [92]. Interakcje pomiędzy płytkami a granulocytami prowadzą do wzajemnej aktywacji, a przy udziale selektyny P – do tworzenia kompleksów granulocytarno-płytkowych [113].

KLASYFIKACJA RECEPTORÓW BŁON PŁYTEK KRWI

Oddziaływanie płytek ze ścianą naczynia, z innymi komórkami, między sobą, oraz ich zdolność do przyjmowania i przekazywania sygnału odbywa się za pośrednictwem specyficznych receptorów [61, 97]. Wyjaśnienie i zrozumienie funkcji powierzchniowych receptorów błony krwinki płytkowej oraz związanych z nimi molekularnych szlaków aktywacji pozwala określić miejsce płytek krwi w homeostazie organizmów i wyjaśnić etiologie takich chorób, jak skazy płytkowe (np. Bernarda-Souliera, von Willebranda), mikroangiopatie czy miażdżyca [6, 15].

Przekazywanie sygnału w czasie aktywacji płytek jest wielostopniowe, a biorące w nim udział cząsteczki chemiczne można zaszeregować do jednej z czterech grup funkcjonalnych:

- 1) receptory,
- 2) enzymy efektorowe (np. cykazy adenylanowa i guanylowa, fosfolipazy, kinaza inozytolo-3-fosforanu),
- 3) wtórne przekaźniki sygnału (np. cAMP, cGMP, DAG, IP₃, PIP₃, Ca²⁺, PTK),
- 4) efekторы wewnątrzkomórkowe (enzymy docelowe, takie jak np. PKA, PKG, PKC, PTK) [49, 54, 61, 87, 104].

Obecność PTK na dwóch poziomach przekazywania sygnału wynika z ich właściwości wzajemnej fosforylacji w łańcuchowej reakcji od receptora aż do enzymu docelowego [49].

Biorąc pod uwagę miejsce receptorów w procesie aktywacji i sposób przekazywania sygnału ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki przyjrzyliśmy się następujący podział funkcjonalny receptorów:

Tabela 1

Receptory odpowiadające za aktywację płytek							
Lp.	Najczęściej spotykane nazwy receptora	Przynależność systematyczna	Ligand(y)	Masa cząsteczkowa	Liczba receptorów na płytkę	Mechanizm działania	Uwagi
1	Receptor trombiny	R7G	trombina	47	1700–2000	PLC β +, AC–PKC β +, PLA $_2$	aktywacja przez odszczepianie N-końcowego peptydu
2	Receptor tromboksanu, TxA $_2$ -receptor	R7G	tromboksan metabolity AA	37	1000–1200	PLC β +, AC–	
	Receptor adrenaliny, α_2 -receptor	R7G	adrenalina epinefryna	64	200–300	AC–	
3	Receptor serotoniny, 5-HT $_2$ -receptor	R7G?	serotonina	220	20–2500	PLC β +	
4	Receptor czynnika aktywującego płytki, PAF-receptor	R7G	PAF	220	200–2000	PLC β +	
5	Receptor wazopresyny, V $_1$ A-receptor	R7G	wazopresyna	125	100	PLC β +	
7	Receptor PGE $_2$		PGE $_2$			PKC +	
8	Receptor ADP	purynowy receptor P $_{2T}$	ADP	43	400–1200 do 18500	AC–, PLC + (?) Ca $^{2+}$	

9	Receptor adenozyiny A $_2$ -receptor	R7G?	adenozyina		5500 22000	0,16 mM 2,9 mM	AC + AC +
10	Receptor prostacykliny PGI $_2$ -receptor	R7G	PGI $_2$, PGE $_1$	85 95	100–300 > 3000	10 nM 1 mM	AC + AC +
11	PGD $_2$ -receptor	R7G	PGD $_2$			10 nM	AC +
Receptory odpowiedzialne za adhezję i agregację							
Receptory nicintegrynowe							
12	GPIV lub IIIb CD36		trombospondyna kolagen	88	12000–19000	PLC γ + PTK	brak receptora bez objawów klinicznych
13	GPVI		kolagen	62		PLC γ + PTK	
14	GPIb/V/IX, receptor vWF (CD42b/CD42c)CD42d/CD42a	sialogliko-proteina bogata w leucynę	vWF	(150/27)82/22	25000	białko 14–3–3 PLC γ_2 +	w zespole Bernarda-Souliera brak GPIb
Receptory integrynowe							
Lp.	Najczęściej spotykane nazwy receptora	Przynależność systematyczna	Ligand(y)	Masa cząsteczkowa	Liczba receptorów na płytkę	Sekwencja rozpoznawana	Mechanizm działania
15	GPIIb/IIIa, receptor kolagenu $\alpha_2\beta_1$, CD49b/CD29, VLA-2	integryna z rodziny β_1	kolagen laminina	153 α /130 β	1000–2000/7000	DGEA	PLC γ_2 +
16	GPIIc/IIa, receptor fibronektyny $\alpha_5\beta_1$, CD49e/CD29, VLA-5	integryna z rodziny β_1	fibronektyna	160 α /130 β	?/7000	RGD	

Tabela 1 (cd.)

Receptory odpowiedzialne za adhezję i agregację							
Receptory integracyjne							
Lp.	Najczęściej spotykane nazwy receptora	Przynależność systematyczna	Ligand(y)	Masa cząsteczkowa	Liczba receptorów na płytkę	Sekwencja rozpoznawana	Mechanizm działania
17	GPIIc*/IIa, receptor lamininy, $\alpha_6\beta_1$, CD49f/CD29	integracyjna z rodziny β_1	laminina	160 α /130 β	?/7000		
18	Receptor vitronektyny $\alpha_v\beta_3$, CD51/CD61	integracyjna z rodziny β_3	vitronektyna trombospondyna	195 α /95 β	1500	RGD	
19	GPIIb/IIIa, receptor fibrynogenu $\alpha_{IIb}\beta_3$, CD41/CD61*	integracyjna z rodziny β_3	fibrinogen, vWF fibronektyna vitronektyna trombospongina	125/25 α 95 β	40000–80000	RGD AQAGDV	PLC γ_2 + PTK +
Receptory uwalniane w czasie aktywacji płytek							
Lp.	Najczęściej spotykane nazwy receptora	Przynależność systematyczna	Ligand(y)	Masa cząsteczkowa	Liczba receptorów na płytkę	Uwagi	
20	GMP-140 PADGEM, selektyna P, CD-62P	selektyna	antygen Lewis X błon fagocytów	140		uwalniany z α -granul	
21	CD-63			53		uwalniany z lizosomów	
Inne receptory							
Lp.	Najczęściej spotykane nazwy receptora	Przynależność systematyczna	Ligand(y)	Masa cząsteczkowa	Liczba receptorów na płytkę	Uwagi	
22	CD9		?	24	?	właściwości kininy, kooperuje z GPIIb/IIIa	
23	CD44	homing-receptor	?	88/95	?		
24	CD38		?		?		

* Trombastenia Glanzmanna mutacja β_3 119.

1) receptory związane białkami G o wysokiej masie cząsteczkowej (związane z aktywacją lub hamowaniem aktywacji płytek),

2) receptory związane białkami G o niskiej masie cząsteczkowej (nieintegrynowe receptory adhezywne oraz integrynowe receptory adhezywne [8, 17, 18].

Klasyczny podział w oparciu o typ budowy cząsteczek receptorów pozwala wyróżnić:

1) receptory jonotropowe (bramkowane kanały jonowe),

2) receptory metabotropowe (R7G),

3) inne, w tym receptory adhezywne obejmujące selektyny, immunoglobuliny, kadheryny, glikoproteiny bogate w leucynę, glikoproteiny CD36-podobne, integryny podrodzin β_1 i β_3 (tab. 1) [3, 13, 19, 38, 54, 100, 103–105].

RECEPTOR TROMBINY

Receptor dla trombiny należy do pierwszej grupy receptorów związanych z białkami G. Na przykładzie jego aktywacji i przekazywania sygnału, przedstawimy schematycznie szlaki metaboliczne zależne od wysokocząsteczkowych białek G. Receptor trombiny posiada typową dla rodziny R7G budowę: jeden polipeptydowy łańcuch z siedmioma hydrofobowymi domenami o strukturze α -heliksu (7TM); ta charakterystyczna budowa jest przyczyną określania go jako receptora serpentynowego albo „węzowatego”. Receptory z siedmioma domenami α -heliksu (7TM) są skojarzone z białkami G na zasadzie wyłącznej obligatoryjności, tzn. działają one zawsze poprzez białka G i odwrotnie, białka G są aktywowane wyłącznie przez ten typ receptorów [107]. N-końcowy fragment łańcucha receptora dla trombiny jest hydrolizowany w pozycji ^{41}Arg - ^{42}Ser przez trombinę związaną w kieszeni hydrofobowych domen TM. Powstająca w ten sposób zmiana konformacyjna generuje sygnał przenoszony do C-końcowej części pozostającej w kontakcie z białkiem G. Omówiony sposób aktywacji jest cechą charakterystyczną dla receptora trombiny, a także, jak się uważa, dla nie do końca scharakteryzowanych receptorów dla trypsyny, katepsyny G i plazminy, określanych jako PAR (ang. *Proteolitically Activated Receptors*) [2, 8, 9, 46, 107].

Białka G

Zarówno receptory aktywowane proteolitycznie, jak i pozostałe receptory R7G przenoszą sygnał za pośrednictwem integralnych białek błony plazmatycznej, posiadających zdolność wiązania nukleotydów guanylowych.

Wysokocząsteczkowe białka G są heterotrimerami typu $\alpha\beta\gamma$ występującymi w płytkach krwi w kilku formach: G_s , G_i , G_q , G_{12} , G_{13} , G_z . Podjednostka α o m. cz. 39–52 kDa, w stanie spoczynku wiąże GDP, zaś po stymulacji przez receptor przylacza GTP, oddysocjowuje od kompleksu $\beta\gamma$ i aktywuje enzym efektorowy. Podjednostka α „dużych” białek G – w odróżnieniu od tzw. „małych” monomerycznych białek G – posiada właściwości GTP-azowe, a więc dysponuje mechanizmem samoograniczania aktywacji. W przypadku receptora trombiny sygnał przekazywany jest przez białko G_q , którego cechą charakterystyczną jest jednoczesna aktywacja fosfolipazy C_γ za pośrednictwem kompleksu α -GTP oraz aktywacja fosfolipazy A_2 przy udziale kompleksu $\beta\gamma$ [10, 63, 104].

Przemiany inozytoli

Zlokalizowana w błonie komórkowej fosfolipaza C hydrolizuje fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan (PIP_2), co prowadzi do powstania dwóch kluczowych wewnątrzkomórkowych mediatorów: diacyloglicerolu (DAG) oraz inozytolotрифосфорану (IP_3) [11]. DAG aktywuje kinazę białkową C, a ta z kolei fosforyluje białko o m. cz. 47 kDa (oraz inne liczne białka cytoszkieletu), odpowiedzialne za inicjację reakcji uwalniania. IP_3 odpowiada za uwalnianie jonów Ca^{2+} z układu kanalików gęstych i systemu tubularnego płytek do cytozolu. Alternatywnym szlakiem jest fosforylacja PIP_2 przez specyficzną kinazę IP_3 -K.

Kinaza fosfatydyloinozytoli składa się z dwóch połączonych ze sobą jednostek o masie cząsteczkowej 110 i 85 kDa, ma dwie domeny SH2 i jedną SH3. Domeny SH2 odpowiadają za interakcję IP_3 -K z kinazami tyrozynowymi, domena SH3 łączy je z cytoszkieletem. Obie domeny znajdują się na podjednostce regulatorowej (85 kDa). Podjednostka katalityczna (110 kDa) przekształca PIP_2 w PIP_3 [5]. Według ostatnich doniesień, powstały w ten sposób PIP_3 , o podobnych właściwościach jak IP_3 , odgrywa znaczącą rolę w przekazywaniu sygnału aktywacji i należy go uważać za mediator równorzędny do IP_3 i DAG [95]. Wykazano także istnienie formy IP_3 -K γ , która jest aktywowana bezpośrednio przez dimer $\beta\gamma$ białka G, w odróżnieniu od wyżej opisanej formy (p85/110), aktywowanej głównie za pośrednictwem niskocząsteczkowego białka G (ρ) [72].

Działanie jonów wapniowych

Jony Ca^{2+} działają jako samoistny, wtórny przekaźnik, lecz częściej wiążą się z białkami zależnymi od wapnia, uruchamiając ich aktywność enzymatyczną. Typowym przykładem tego mechanizmu jest aktywowana

przez Ca^{2+} kalmodulina (CaM). Fosforyluje ona m. in. kinazę lekkiego łańcucha miozyny, a co za tym idzie – inicjuje fosforylację miozyny i tworzenie filamentów łączących się z filamentami aktyny, odpowiadając w ten sposób za zmiany kształtu płytki [17, 107, 110].

Metabolizm kwasu arachidonowego

Oprócz zmian w aktywności białek cytoszkieletu aktywowanych przez jony Ca^{2+} , jony te wywołują aktywację fosfolipazy A_2 (PLA_2), a w następstwie tego hydrolizę fosfolipidów błony (fosfatydyloinozytolu i fosfatydylocholine) i uwolnienie kwasu arachidonowego (AA). AA w czasie oddziaływania trombiny z jej receptorem uwalniany jest co najmniej na dwa sposoby: poprzez bezpośrednią aktywację układu receptor–kompleks $\beta\gamma$ (białka G)– PLA_2 , lub na drodze szlaku receptor–kompleks α –GTP–PLC γ –PIP $_2$ –PI $_3$ – Ca^{2+} – PLA_2 [8, 63, 87]. Należy także brać pod uwagę trzeci mechanizm, w którym kwas arachidonowy powstaje na skutek działania lipazy diacyloglicerolu (hydroliza fosfolipidów) [58].

Przemiany AA w płytkach krwi odbywają się w dwóch odmiennych układach. Pod wpływem 12-lipooksygenazy kwas arachidonowy przekształcony zostaje do kwasu 12-hydroksyeikozatetraenowego (12-HETE), który posiada wprawdzie zdolność hamowania aktywacji płytek, lecz jest produkowany głównie „na eksport” – jako substrat dalszych przemian w leukocytach. W układzie zależnym od cyklooksygenazy z AA powstają cykliczne nadtlenki prostaglandynowe PGG $_2$ i PGH $_2$, a z nich – w płytkach krwi tromboksan TXA $_2$, a w śródbłonku prostacyklina – PGI $_2$. Z cząsteczek PGH $_2$ syntetyzowane są: TXA $_2$, 12-HTT i MDA (oznaczany często jako marker tej reakcji) [74]. Produkty utleniania kwasu arachidonowego posiadają na powierzchni płytek swoiste receptory i za ich pośrednictwem regulują funkcje cyklazy adenylanowej.

Receptor TXA $_2$ – podobnie jak receptory serotoniny (5-HT $_2$), czynnika aktywującego płytki (PAF), adrenaliny (α_2 -adrenergiczny) i wazopresyny – należy do grupy R7G: działając za pośrednictwem „dużych” białek G receptory te stymulują PLC i wywołują aktywację płytek krwi. Działanie więc mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego: aktywacja receptora trombiny powoduje uwalnianie z płytek TXA $_2$, który przez specyficzny receptor nasila wcześniej omówione mechanizmy aktywacji. Oprócz tromboksanu reakcje takie wywołują także cykliczne nadtlenki prostaglandynowe [26].

Układ cykazy adenylnowej

Ważnym elementem regulacji odpowiedzi płytek na działanie agonistów jest hamowanie przez trombinę i TXA_2 cykazy adenylnowej (AC). Oba receptory (dla trombiny i dla TXA_2) współdziałają z białkiem G_i , które inhibując AC blokuje mechanizm ograniczania aktywacji płytek zależny od cAMP [85].

Centralnym elementem układu hamowania pobudzenia płytek krwi jest funkcjonalny kompleks: receptor prostacykliny, białko G_s i AC. Cyklaza adenylnowa syntezując z ATP cAMP aktywuje kinazy białek zależnych od cAMP, które z kolei katalizują transfer grupy fosforanowej z ATP na enzymy docelowe, co powoduje zmiany konformacyjne blokujące centra aktywne tych enzymów [54]. Podobnie jak w układzie samoograniczania aktywacji białek G (GTP-azowe właściwości podjednostki α), wzrost stężenia cAMP jest regulowany, a za funkcję tę odpowiedzialna jest fosfodiesteraza hydrolizująca cAMP do AMP.

Regulacja aktywności enzymów w procesach aktywacji i jej hamowania polega na naprzemiennym fosforylowaniu przez kinazy oraz defosforylacji przez fosfatazy; zależnie od typu kinaz mogą być indukowane przeciwstawne reakcje [72]. Na przykład, w przypadku cAMP, kinazy od niej zależne wywołują silny efekt hamowania aktywności białek odpowiedzialnych za aktywację.

Za ten typ regulacji odpowiadają receptory $R7G$ związane z białkami G_s : receptor prostacykliny (PGI_2), receptory prostaglandyn PGD_2 , PGE_2 , jak również receptor adenozyiny ($G_o?$). Większość receptorów metabotropowych związanych z białkami G może wpływać na funkcjonowanie kanałów jonowych, np. G_s może blokować kanał Na^+ i aktywować kanał Ca^{2+} , zaś G_i hamuje kanał Na^+ i stymuluje kanał K^+ [5].

Układ cykazy guanylowej

Cyklaza guanylowa w płytkach krwi działa podobnie jak cyklaza adenylnowa: przy udziale kinaz białkowych (fosforylacja) blokuje enzymy przekazujące wewnątrzkomórkowe sygnały aktywacji [47]. Uaktywnienie wytwarzania cGMP hamuje efekt pobudzenia receptora trombiny w zakresie większości molekularnych szlaków aktywacji. Układ cGMP działa prawdopodobnie w sprzężeniu z białkami G w sposób uzależniony od stężenia jonów Mg^{2+} [22].

W płytkach krwi bardziej istotny wydaje się mechanizm bezpośredniej generacji cGMP indukowanej przez tlenek azotu. Tlenek azotu jest krótko-trwałym rodnikiem o właściwościach cząsteczki sygnałowej; mała wielkość

i lipofilowy charakter umożliwiają jej bezpośrednie wnikanie do wnętrza płytek z pominięciem systemów receptorowych [22]. NO odgrywa znaczącą rolę w homeostazie układu krążenia, a coraz liczniejsze prace donoszą o przeciwpłytkowym działaniu produktów przemiany azotowej przekształcanych do NO [4, 22, 65].

RECEPTOR ADP

Pierwszym opisanym agonistą krwinek płytkowych był ADP. Receptory purynowe na płytkach są nieswoiste: rozpoznają zarówno ADP jak i ATP, a ich rola w procesie aktywacji jest w dalszym ciągu nie do końca poznana.

Przyłączenie agonisty do receptora ADP uruchamia prawdopodobnie trzy szlaki aktywacji:

- 1) hamowanie cyklazy adenylanowej za pośrednictwem G_i ,
- 2) aktywacja fosfolipazy C poprzez G_s (nie jest w pełni udowodnione),
- 3) napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki.

Receptor P_{2T} , podobnie jak purynowe receptory w innych komórkach, uczestniczy bezpośrednio w regulacji stężenia Ca^{2+} w cytozolu [8, 32–34, 104]. Jest wysoce prawdopodobne, że ADP może reagować z różnymi typami (podtypami) receptorów: 1) P_{2X1} – odpowiedzialnym za szybkie uwalnianie Ca^{2+} (receptor jonotropowy), 2) P_{2Y1} – hamującym AC, 3) P_{2Y} – uwalniającym IP_3 (receptor metabotropowy). ADP jest agonistą działającym na płytki bezpośrednio, lecz częściej po zadziałaniu silniejszego czynnika (trombina, kolagen) jest on uwalniany z ziarnistości gęstych, oraz wtórnie potęguje efekt agregacji płytek krwi. Już niskie stężenia ADP potęgują działanie innych agonistów. Charakterystyczna jest dla tego agonisty dwufazowa agregacja w osoczu bogatopłytkowym: małe dawki wywołują zmianę kształtu, mobilizację integryn, przyłączanie fibrynogenu i odwracalną agregację. Wyższe stężenia ($> 5 \mu M$) wywołuje reakcję uwalniania, która dostarczając dużych ilości płytkowego TXA_2 , ADP, Ca^{2+} i fibrynogenu, wzmacnia i utrwala agregację. Większość informacji uzyskanych w badaniach na cytrynianowym osoczu fałszuje jednak rzeczywisty obraz mechanizmu działania ADP na płytki z powodu chelatowania Ca^{2+} przez antykoagulant [34]. Płytki w środowisku osocza bogatopłytkowego izolowane z krwi pobranej na hirudynę nawet przy stężeniu ADP $10 \mu M$ nie wytwarzają TXA_2 , i pomimo prawidłowej agregacji nie wykazują reakcji uwalniania. W tych samych badaniach wyraźnie obserwowano dynamiczne zmiany w cytoszkielecie pod wpływem ADP, ściśle związane z aktywacją receptorów fibrynogenu [75].

RECEPTOR KOLAGENU

Opisano i scharakteryzowano na powierzchni błony cytoplazmatycznej płytek krwi trzy podstawowe receptory w specyficzny sposób wiążące kolagen. Są to: GPIIb/IIIa (integryna $\alpha_2\beta_1$), GPVI (P62) oraz GPIV (CD36) [81]. Reprezentują one grupę opisywaną jako receptory odpowiedzialne za adhezję i/lub agregację. Jednakże, ponad wszelką wątpliwość, uczestniczą one także w przekazywaniu sygnałów i jest prawdopodobne, że w niektórych przypadkach inicjują aktywację płytek krwi. Szczególną rolę w tym względzie przypisuje się receptorowi dla kolagenu i trombospondyny (CD36, GPIV), który odpowiada za inicjację adhezji. Jest on przedstawicielem licznej, występującej także na monocytach śródbłonnku i erytrocytach, rodziny jednołańcuchowych receptorów. Cechą charakterystyczną tej grupy jest oporność na proteolizę, wynikająca z dużego stopnia glikozylacji N-końcowej części łańcucha polipeptydowego. Z punktu widzenia przenoszenia sygnału istotna jest wielofunkcyjność tej glikoproteiny: oprócz kolagenu i trombospondyny oddziałuje ona z monocytami oraz uczestniczy w przemianach lipoprotein [20]. Przyłączenie ligandu wywołuje dimeryzację receptora i aktywację przemian AA [24], oraz aktywację kompleksu kinaz tyrozynowych, przyłączonych do C-końcowej części łańcucha receptora [19, 60].

Kinazy tyrozynowe

Z receptorem CD36 w płytkach krwi łączą się niereceptorowe kinazy tyrozynowe (PTK) z rodziny src: pp60^{fyn}, pp60^{src} i pp62^{yes} (udział w tym kompleksie pp60^{c-src} jest sporny) [19]. Bez względu na skład, wykazano znaczną trwałość tych kompleksów, co przemawia za bezpośrednim udziałem GPIV w uruchamianiu szlaku kinaz tyrozynowych [60, 87]. W mechanizmie aktywacji zależnym od kinaz uczestniczą także kinazy serynowo-treoninowe (*raf*), fosfolipaza C γ_1 , fosfatazy kinaz tyrozynowych (PTP1B, SHPTP1) [72, 73, 83, 108], białka wiążące aktynę (spektryna, winkulina) oraz niskocząsteczkowe białka G (białka *ras*). Po zadziałaniu czynnika stymulującego receptory ulegają dimeryzacji, tak że ich cytoplazmatyczne domeny wchodzi w bezpośredni kontakt, co umożliwia wzajemną fosforylację [19]. Domeny SH2 umożliwiają łączenie się kinaz w łańcuchu wzajemnych fosforylacji, domeny SH3 odpowiadają za połączenie kinaz z białkami cytoszkieletu [49].

W aktywowanych płytkach dochodzi do gwałtownej fosforylacji reszt tyrozynowych w kaskadzie fosforylacji białek wzbudzających i regulatorowych. Wywoływanie tych reakcji może zachodzić bezpośrednio, jak ma to miejsce w przypadku kolagenu i GPIV (kinazy src), lub pośrednio – przy udziale kinaz tyrozynowych typu pp125^{fak}, np. w czasie aktywacji GPIIb/IIIa i więk-

szości pozostałych glikoprotein odpowiedzialnych za adhezję i aktywację płytek krwi [42, 99, 100].

Akceptowany schemat procesu aktywacji zachodzący w płytkach krwi po przyłączeniu kolagenu do receptora CD36 przedstawia się następująco. Ufosforylowany C-końcowy fragment receptora stanowi miejsce dokowania rozpoznawane przez domenę SH2 kinazy tyrozynowej. Po przyłączeniu kolagenu odblokowana zostaje domena katalityczna PLC γ_1 , która jako jedyna izoforma z tej grupy posiada domenę SH2. Domena ta rozpoznaje charakterystyczne miejsce wiązania, przyłącza się do kinazy tyrozynowej, i zostaje ufosforylowana, co uruchamia jej aktywność fosfolipazową wobec PIP $_2$ oraz warunkuje powstanie IP $_3$ i DAG [5, 95]. Aktywne kinazy tyrozynowe aktywują także IP $_3$ -K, która generuje trzeci inozytolopochodny mediator aktywacji – PIP $_3$ [14, 107].

W obrębie takiego funkcjonalnego kompleksu działają także białka ograniczające aktywację: fosfatazy, które defosforylując kinazy tyrozynowe w pozycji 527 Tyr blokują ich zdolność do łączenia z substratem, a także białko aktywujące GTP-azę (GAP), niezbędne do stymulowania aktywności fosfatazowych białek z rodziny *ras* (niskocząsteczkowe białka G). Te mechanizmy ograniczające równoważą silny wielokierunkowy impuls powstający w obrębie kompleksu ligand-receptor. Regulatorowa funkcja fosfataz, zarówno serynowo-treoninowych (PP1, PP2A, PP2B, PP2C), jak i tyrozynowych (SHP-1, PTP1B), warunkuje prawidłowe przekazywanie sygnału aktywacji, niezależnie od drogi pierwotnego wzbudzenia (agonista, przyłączanie kolagenu i/lub fibrynogenu) [72, 91].

Interesujący, wcześniej nie omawiany, szlak aktywacji inicjowany na drodze bezpośredniej aktywacji PTK poprzez receptor CD36 (prawdopodobnie także po zadziałaniu trombiny i przyłączeniu fibrynogenu), rozpoczyna się w momencie aktywacji kinazy serynowo-treoninowej *raf* przez białko *ras* [49]. Reakcja ta zapoczątkowuje kaskadę, w której uczestniczą kinaza kinazy białkowej aktywowanej przez mitogeny (MAPKK) i sama kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny (MAP) aktywująca PLA $_2$ [9].

Badania kompleksów receptor-PTK w płytkach krwi pozwalają stwierdzić obecność ufosforylowanych (aktywowanych) postaci tych enzymów, szczególnie po działaniu tzw. silnych agonistów, takich jak trombina czy kolagen, lecz sekwencja kolejnych fosforylacji w molekularnym szlaku przekazywania sygnałów wewnątrz płytek krwi pozostaje wciąż niejasna. Podjęto starania dopasowania jej schematu do lepiej poznanych modeli [21, 60], analogie te są jednak ograniczone. Trudno w dalszym ciągu określić np. dokładnie miejsca oddziaływania kinazy pp60 src , co do której wiadomo, że jako najliczniej występująca w płytkach, musi zajmować kluczową pozycję w przekazywaniu sygnałów transdukcyjnych [28].

RECEPTOR CZYNNIKA VON WILLEBRANDA

Mechanizm powstawania sygnału aktywacji po przyłączeniu cz. von Willebranda do makromolekularnego kompleksu GPIb-IX-V różni się od opisanego powyżej. Wiadomo, że monomery ligandu hamują aktywację płytek, dimery nie wywołują żadnej reakcji, i dopiero przyłączenie multimerów oraz zaangażowanie większej liczby receptorów wyzwala sygnał transdukcyjny [59, 77, 97]. Liczba kopii poszczególnych glikoprotein w kompleksie (GPIb i GPIX po 25 000, GPV 11 000), dwufunkcyjność (jest aktywowany i funkcjonuje także jako receptor dla trombiny [79, 80] oraz znaczenie kliniczne receptora wskazują na wiodącą rolę GPIb (łańcuch $Ib\alpha$) w regulacji funkcji płytek krwi [8, 17, 45, 77]. Rola GPIX i GPV w omawianym receptorze nie jest do końca zbadana, postuluje się udział łańcucha $Ib\beta$ i GPIX w utrzymywaniu właściwej ekspresji całego kompleksu [16]. GPIb może wiązać się z ligandami wolno krążącymi (sporadycznie występujące w krwioobiegu multimery vWF), głównie jednak oddziałuje z odsłoniętą po uszkodzeniu śródbłonna macierzą zewnątrzkomórkową, która zapewnia czynnikowi von Willebranda zmiany konformacyjne umożliwiające przyłączenie i aktywację receptora. GPIb jest sialoglikoproteiną niekowalencyjnie połączoną z GPIX i GPV. Prawdopodobny mechanizm przenoszenia sygnału po przyłączeniu cząsteczek ligandu związany jest z połączeniem GPIb α za pośrednictwem filaminy z mikrofilamentami aktynowymi (włókna napięciowe). W fazie spoczynku połączenie cytoszkieletu z kompleksem GPIb-IX-V stabilizuje błonę płytkową; w zespole Bernarda-Souliera (brak GPIb) płytki przybierają gigantyczne rozmiary, a ich błona łatwo ulega deformacjom [97]. Miejsce wiązania vWF zlokalizowane jest w N-końcowej części łańcucha Ib , zaś w C-końcowym fragmencie łańcucha α w pozycji 166 znajduje się ufosforylowana seryna [17]. W czasie aktywacji seryna 166 ulegając defosforylacji zapoczątkowuje reorganizację struktur fibrylarnych i kaskadę fosforylacji w kompleksie funkcjonalnym: PLC, PI-3K, pp60c-src, białko 14-3-3 (o własnościach PLA_2) [16, 17]. Udział poszczególnych składowych kaskady fosforylacji oraz sposób przekazywania sygnału wydają się być podobne do omówionego wcześniej przy okazji charakterystyki receptora dla kolagenu (CD36). Receptor po przyłączeniu vWF bierze udział w aktywacji GPIIb/IIIa, zmieniając jego konformację ze spoczynkowej na umożliwiającą przyłączanie fibrynogenu, oraz łącząc pobudzone w ten sposób integryny z cytoszkieletem [30]. Przyjmuje się, że występujące w naczyniach tętniczych duże siły ścinające oraz kontakt z obcymi powierzchniami są istotnymi czynnikami aktywującymi płytki krwi za pośrednictwem kompleksu GPIb-IX-V [8, 17, 30, 39, 80, 97, 98].

Reorganizacja cytoszkieletu

W stanie spoczynku pęczki mikrofilamentów aktynowych (włókna napięciowe) sieciowane przez miozynę tworzą podstawę cytoszkieletu płytki. Aktyna, stanowiąca 20–30% wszystkich białek płytki, występuje także w postaci globularnej, która pod wpływem pobudzającego bodźca wyzwolonego po przyłączeniu ligandu do receptora ulega polimeryzacji (każda cząsteczka przyłącza jeden jon Ca^{2+} jedną cząsteczkę ATP), a przyłączając się do włókien napięciowych o zreorganizowanej strukturze wytwarza „superfilamenty aktynowe”. W czasie aktywacji lekkie łańcuchy miozyny, po ufosforylowaniu przez kinazy zależne od jonów Ca^{2+} , wytwarzają w interakcji z ciężkimi łańcuchami filamenty miozynowe sieciujące włókna aktyny. W procesach zmiany kształtu i podczas oddziaływania z receptorami biorą także udział białka wiążące cytoszkielet z receptorami (talina, winkulina, α -aktynina), profilina kontrolująca polimeryzację aktyny oraz białka z rodziny *rho* (niskocząsteczkowe białka G) odpowiedzialne za przenoszenie sygnału do wnętrza komórki [41, 87]. Należy przypuszczać, że podobnie jak ma to miejsce w limfocytach, niektóre białka cytoszkieletu (spektryna) uczestniczą także w aktywacji kinazy białkowej C [93].

RECEPTOR FIBRYNOGENU

Kompleks glikoprotein IIb/IIIa, tworzący integrynę $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, jest najliczniej reprezentowanym receptorem na powierzchni błony płytkowej (40 000–50 000 kopii w płytkach w stanie spoczynkowym) [13, 31, 89, 101, 112]. Posiada on typową dla wszystkich integryn budowę. Podjednostka β_3 (GPIIIa, CD61) o m. cz. 95 kDa, składa się z 762 reszt aminokwasowych oraz posiada charakterystyczną pętlę N-końcowej części łańcucha. Region 109–136 jest miejscem wiążącym sekwencję RGD fibrynogenu; region 212–222 to miejsce wiążące nieopisaną sekwencję fibrynogenu, dodatkowo podjednostka ta zawiera jedno miejsce wiążące jony Ca^{2+} . Mutacja powodująca zastąpienie asparaginy tyrozyną w pozycji β_3 -119 jest przyczyną występowania trombastenii Glanzmanna. Podjednostka α_{IIb} składa się z dwóch łańcuchów zawierających łącznie 1170 reszt aminokwasowych, a regionem odpowiedzialnym za oddziaływanie z sekwencją KQAGDV fibrynogenu jest fragment 294–314 tej podjednostki. Na podjednostce α_{IIb} (łańcuch A o m. cz. 125 kDa) zlokalizowano także cztery miejsca wiążące jony Ca^{2+} . Łańcuch B (m. cz. 25 kDa) podjednostki α_{IIb} , połączony z fragmentem A za pomocą mostka disiarczkowego, mocuje całą podjednostkę do błony płytkowej [13, 23, 40, 90]. Na łańcuchach

A α fibrynogenu znaleziono sekwencje aminokwasowe RGD-F (95–97) i RGD-S (572–574), natomiast na łańcuchach γ znaleziono sekwencję KQAGDV (406–411). Należy podkreślić, że sekwencja RGD występuje także w kolagenie (typ VI), fibronektynie, witronektynie i czynniku von Willebranda, stąd zdolność wiązania tych białek z integryną $\alpha_{IIb}\beta_3$. Przyjmuje się obecnie, że o specyficzności wiązania fibrynogenu do integryny $\beta_{IIb}\beta_3$ decyduje sekwencja KQAGDV [13, 38, 42, 88, 103].

W czasie następujących po sobie etapów aktywacji płytek nie zmienia się drastycznie liczba receptorów dla fibrynogenu, lecz głównie ich konformacja i rozmieszczenie na błonie cytoplazmatycznej. Receptory te przechodzą ze stanu spoczynkowego w pobudzony, nabywając zdolność trwałego przylączenia wolnokrążącego fibrynogenu, oraz gromadzą się w ogniskach aktywacji. Omówiona wcześniej reorganizacja cytoszkieletu odgrywa kluczową rolę w powstawaniu takich ognisk adhezji receptorów. O przemianach tych decydują omówione wcześniej receptory pierwszego kontaktu przekazujące sygnał z wnętrza komórki (*inside-out signalling*). W odbiorze impulsu aktywującego uczestniczą oba cytoplazmatyczne fragmenty integryny, które ulegając fosforylacji powodują zmianę konformacji części receptorowej oraz oddziaływanie z cytoszkieletem (za pośrednictwem α -aktyniny, F-aktyny, taliny, filaminy) [17, 23, 99]. Oddziaływania takie sprzęgają receptor fibrynogenu z systemem przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, w skład którego wchodzi: białka cytoszkieletu, niskocząsteczkowe białka G (*rho*), IP3-K (forma 85/110), PTK (pp125^{fak}, pp72^{syk}, c-src), PLC γ oraz fosfatazy [10, 23, 99]. Wokół cytoplazmatycznego fragmentu receptora fibrynogenu powstaje swoiste „centrum aktywacji”, którego lista składników jest stale uzupełniana i poszerzana o nowo odkryte białka regulatorowe (np. β_3 -edoneksyna) uczestniczące w uruchamianiu wielu szlaków aktywacji płytek krwi (*outside-in signalling*) [23].

RECEPTORY POJAWIAJĄCE SIĘ W NASTĘPSTWIE AKTYWACJI KRwinek PŁYTKOWYCH

W czasie degranulacji na powierzchni błony krwinki płytkowej pojawiają się glikoproteiny GMP-140 (selektyna P) i GP-53 [3, 8, 51, 55, 78]. Określanie ekspresji GP53 i GMP-140 ma istotne znaczenie przy monitorowaniu zachodzenia reakcji uwalniania [86]. Obecnie oznaczanie glikoprotein pojawiających się w czasie aktywacji płytek krwi jest jedną z najczęściej stosowanych metod w monitorowaniu stopnia aktywacji płytek w pracach klinicznych i teoretycznych [51, 55, 56, 82, 109].

GMP-140

GMP-140, znana też jako PADGEM (*Platelet Activation-Dependent Granule External Membrane protein*) lub antygen CD62, należy do grupy selektyn (opisywana jest często także jako selektyna P). Rodzina selektyn odpowiada za regulację adhezji między leukocytami, aktywowanymi płytkami i komórkami śródbłónki, a uczestniczą w niej oprócz omawianej selektyny P (płytki, śródbłonek), selektyna E (śródbłonek) i selektyna L (leukocyty) [3, 25, 36]. Selektyna P jest cząsteczką stanowiącą składnik błony ziarnistości α płytek i pełni funkcje receptora dla proteoglikanu Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) (Sialyl Lewis X, CD15s) obecnego na powierzchni fagocytów. Stwierdzono, że selektyna P reguluje interakcje płytek z wolno krążącymi leukocytami [3, 8, 64, 78]: jej zwiększoną ekspresję notowano we wczesnych fazach aktywacji płytek, w następstwie zabiegów operacyjnych [94], zauważono, że pojawia się ona także za pośrednictwem otwartego systemu kanalików na powierzchni błony płytkowej w czasie rozpostarcia płytek na sztucznych powierzchniach [25, 51]. Ta jednołańcuchowa sialoglikoproteina występuje także w ciałkach Weibel-Palade'a komórek śródbłónki i przypomina swoją budową adhezywne białka leukocytów (LAM-1 i ELAM-1) [64].

GP53

Po zadziałaniu silnych agonistów, takich jak trombina, na powierzchni aktywowanych płytek krwi pojawia się cząsteczka będąca składnikiem błon lizosomalnych. W terminologii kompleksów różnicowania określono ją jako CD63 [3, 78]. Uwalnianie tej glikoproteiny zaobserwowano m. in. podczas kontaktu płytek z obcymi powierzchniami, np. w czasie zabiegów z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego [84].

ZNACZENIE INTERAKCJI BIAŁKOWO-LIPIDOWYCH SKŁADNIKÓW BŁON PŁYTEK KRWI W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK

Ruchliwość lipidów dwuwarstwy błony komórkowej definiuje parametr zwany płynnością lipidową błon: w błonach bardziej płynnych łańcuchy acylowe kwasów tłuszczowych fosfolipidów błony wychylają się z większą częstością i o większy kąt niż w błonach o większej mikrolepkości dwuwarstwy lipidowej [102]. Płynność lipidowa reguluje istotnie stopień ruchliwości białek integralnych zanurzonych w matrycy lipidowej. Następstwem niskiej płynności lipidowej jest ograniczona ruchliwość lateralna i rotacyjna białek

integralnych. Bezpośrednią implikacją tej zależności są zmiany stopnia ekspozycji białek, a przez to dostępności receptorów błonowych, uzależnione od zmian płynności lipidowej błon. W błonach mniej płynnych, zanurzone w dwuwarstwie lipidowej białka błonowe są silniej eksponowane i wystają w większym stopniu do środowiska zewnętrznego lub cytoplazmatycznego, a stopień ich ekspozycji jest uwarunkowany równowagą termodynamiczną oddziaływań lipid-lipid oraz lipid-woda [102]. Uwarunkowania zmian ruchliwości lipidów oraz konformacji białek nie dotyczą w równomiernym stopniu całej błony, lecz odnoszą się zazwyczaj jedynie do wybranych domen dwuwarstwy lipidowej. Stąd też, modulacja płynności lipidowej w otoczeniu wybranego receptora (lub receptorów), w następstwie interakcji z ligandem, pociąga za sobą zmiany w mikrośrodowisku receptorów sąsiadujących, nawet nie związanych z żadnym ligandem. Wszelkie zmiany konformacyjne doprowadzające do zmian hydrofobowości cząsteczki białkowej lub zmian jej ładunku powierzchniowego mogą prowadzić do zmian ekspozycji wybranych domen w cząsteczkach białkowych, czego bezpośrednią konsekwencją może być zmieniona dostępność receptora dla ligandów [102].

Proces przekazywania sygnałów przez błonę cytoplazmatyczną wymaga optymalnej płynności dwuwarstwy błony, tzn. takiej, która zapewnia odpowiednią konformację składowych łańcucha przekazywania i przenoszenia informacji [4, 66]. Przypuszcza się na przykład, że receptor powierzchniowy błony cytoplazmatycznej na skutek zaburzonych oddziaływań z lipidami granicznymi (zmiana płynności), może zmieniać swoją strukturę czwartorzędową, co wyzwała, za pośrednictwem jego C-końca, zmiany konformacji białka G i powstawanie niespecyficznego (nie związanego z przyłączeniem ligandu) sygnału aktywacji komórki. W literaturze opisywano zjawiska biofizycznej – zależnej od płynności – aktywacji lub inhibicji białek uczestniczących w przenoszeniu sygnału. Obecność etanolu upłynniającego centralny region dwuwarstwy lipidowej związana była ze stymulacją białka Gs, wzrostem wewnątrzkomórkowego cAMP i hamowaniem aktywacji płytek krwi [29, 106]. Wykazano także, że niektóre organiczne rozpuszczalniki (chloroform, alkohol benzylowy), upłynniając warstwę lipidów granicznych, mogą aktywować kinazę białkową C [43, 68], podczas gdy halotan, upłynniając warstwę centralną, wywiera efekt odwrotny. Zależną od fosfolipidów aktywację PKC zaobserwowano podczas badania przewodzenia sygnału aktywacji w limfocytach [93]. Zwraca się także uwagę, że wpływ wybranych leków na płynność dwuwarstwy lipidowej może mieć także charakter specyficzny: poprzez aktywację fosfolipido-N-metylotransferazy dochodzić może do metylacji fosfatydyloetanolaminy, zwiększenia puli błonowej fosfatydylocholiny (lecytyny) i, w następstwie, do upłynnienia dwuwarstwy [50]. Ogólnie, dowody doświadczalne, które potwierdzałyby znaczenie i rolę interakcji lipidowo-białkowych w modulacji przekazywania sygnału w komórce

poprzez oddziaływanie na przekaźniki tego sygnału dotyczą niemal wyłącznie kinazy białkowej C oraz cykazy adenylanowej. W badaniach modelowych z liposomami wykazano, że oddziaływania takie są obustronne. Stosując metodę gaszenia fluorescencji tryptofanu w cząsteczce PKC Brumfeld i Lester wykazali, że enzym penetruje dwuwarstwę lipidową do głębokości 16 węgla łańcuchów acylowych fosfolipidów, a interakcje takie indukują przejścia heksagonalne fosfolipidów w błonach liposomalnych [69]. Z drugiej strony, w różnych badaniach wykazano, że polarność dwuwarstwy oraz skład fosfolipidów wpływa i moduluje aktywność PKC. Kwas linolenowy, który działał upłynniająco na dwuwarstwę lipidową, aktywował PKC w połowie tak efektywnie, jak DAG [67]. Z kolei, fosfatydyloseryna, która sprzyja przejściom heksagonalnym fosfolipidów błon, okazała się najbardziej wydajna w aktywacji PKC [69]. Ogólnie, wykazano, że „upłynniacze” błon w stężeniach, które zwiększają hydrofobowy charakter otoczenia PKC, aktywują enzym [68], zaś obecność diacyloglicerolu ułatwiała i przyspieszała penetrację PKC w dwuwarstwie lipidowej [71]. Chociaż wskazuje się, że trzeciorzędowa struktura PKC jest stabilizowana zarówno przez Ca^{2+} , jak i Mg^{2+} [71], to zaobserwowano, że zmiany konformacyjne w PKC są niemal natychmiastowe w obecności Mg^{2+} , ale wymagają czasu w obecności Ca^{2+} [70]. Znaczenie tej różnicy łatwo docenić, zważywszy że jony wapnia działają powszechnie jako wtórny przekaźnik sygnału aktywacji.

Równie przekonujących dowodów dostarczono na poparcie znaczenia płynności lipidowej błon w regulacji aktywności cykazy adenylanowej. Etanol, który zwiększa aktywność cykazy adenylanowej na drodze mechanizmu aktywacji białka G_s [44], nie jest pod tym względem unikalny, gdyż jak stwierdzono, krótkołańcuchowe alkohole alkilowe i alkohol benzyłowy mają zdolność hamowania agregacji płytek oraz aktywacji płytkowej cykazy adenylanowej [52]. Badania molekularnych mechanizmów działania lokalnych anestetyków, takich jak alkohol benzyłowy, pozwoliły wykazać, że mogą one pośrednio aktywować cyklazę adenylanową na drodze aktywacji białka G_s poprzez mechanizm dysocjacji podjednostki $\beta\gamma$ białka G_i [106].

Zmiany płynności lipidowej należy pojmować jako sposób odreagowywania komponent błonowych na sygnały ze strony cytoplazmy komórki lub ze strony środowiska zewnętrznego. Zmiany dynamicznych parametrów błon komórkowych płytek krwi w niektórych stanach klinicznych mogą powodować reorganizację dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej płytek krwi. Reorganizacja taka może się sprowadzać w równym stopniu do zmian konformacyjnych glikoprotein powierzchniowych (w tym receptorów), jak i dotyczyć frakcji lipidów granicznych. W nowych warunkach może dochodzić do interakcji białkowo-lipidowych, których efektem jest uwalnianie wewnątrzpłytkowego Ca^{2+} oraz niespecyficzne pobudzenie enzymów efektorowych. Hipotezę taką potwierdzałyby wyniki wskazujące, że różne

czynniki modulujące płynność błon powodują dezorganizację dwuwarstwy lipidowej błon płytkowych i drastycznie ograniczają transdukcję wielokanałowego sygnału prowadzącego do aktywacji płytek krwi. Wykazywana zależność między modulacją płynności lipidowej przez anestetyki i rozpuszczalniki organiczne a ich aktywującym wpływem na kinazę białkową C, jak również wpływ tych związków na aktywację cyklazy adenylanowej oraz wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP może stanowić potwierdzenie takiej hipotezy [12, 68, 106]. Należy pamiętać, że w przekazywaniu sygnału przez błonę cytoplazmatyczną biorą udział integralnie związane z nią białka: receptory błonowe, białka G oraz enzymy efektorowe (PLC, PLA₂, CA). Do prawidłowej kooperacji wszystkich elementów i prawidłowego przewodzenia sygnału aktywacji konieczna jest optymalna płynność błony umożliwiająca właściwą konformację białek błonowych oraz niezakłócone interakcje białkowo-lipidowe. Związek indukowanej w warunkach *ex vivo* aktywacji płytek ze zmianami płynności błon płytkowych, jakie towarzyszyły takiej aktywacji, skłaniają do wysunięcia hipotezy, że zmiany parametrów dynamicznych błon krwinek płytkowych mogą leżeć u podstaw nieswoistej generacji i transdukcji sygnału w płytkach w niektórych stanach patologicznych związanych ze zmianami płynności błon komórkowych [111]. W dodatku, można teoretycznie założyć, że osoby „obciążone dziedzicznie” typem błony komórkowej o parametrach biofizycznych predysponujących do łatwego wyzwalańia sygnału aktywacji płytek krwi powinny być bardziej narażone na częste epizody aktywacji i reakcji uwalniania płytek krwi.

Chociaż w obecnej chwili trudno znaleźć w literaturze wyczerpujące i jednoznaczne wyjaśnienie zależności między płynnością dwuwarstwy lipidowej a przekazywaniem sygnału aktywacji w komórce, należy podkreślić, że zebrane dotąd wyniki dotyczące różnych komórek i układów modelowych wskazują niezbicie na kluczowe znaczenie stanu dynamicznego błony cytoplazmatycznej w procesach transdukcji sygnału.

LITERATURA

- [1] Amirkhosaravi A., Alexander M., May K., Francis D. A., Warnes G., Biggerstaff J. (1996), *Thromb. Haemost.*, **75**, 87–95.
- [2] Bahou W. F., Schmidt V. A. (1996), *Platelets*, **7**, 253–260.
- [3] Baj Z. (1996), *Centr. Eur. J. Immunol.*, **21**, 119–127.
- [4] Bakken A. M. (1996), *Platelets*, **7**, 347–349.
- [5] Barańska J. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 138–151.
- [6] Bennett J. S., Kolodziej M. A. (1992), *Dis. Mon.*, **38**, 577–631.

- [7] Bevers E. M., Comfurius P., Reutelingsperger C. P., Zwaal R. F. (1996), *Platelets: a practical approach*, red. S. Watson, P. K. Authi, S. Oxford University Press, Oxford, 320-340.
- [8] Blockmans D., Deckmyn H., Vermeylen J. (1995), *Blood Reviews*, **9**, 143-156.
- [9] Brass L. F. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 499-505.
- [10] Brass L. F., Manning D. R., Cichowski K., Abrams C. S. (1997), *Thromb. Haemost.*, **78**, 581-589.
- [11] Brass L. F., Joseph S. K. (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 15172-15179.
- [12] Brumfeld V., Lester D. S. (1990), *Arch. Biochem. Biophys.*, **277**, 318-323.
- [13] Cierniewski C. S. (1994), *Post. Bioch.*, **40**, 45-53.
- [14] Clark E. A., Shattil S. J., Brugge J. S. (1994), *TIBS*, **19**, 469.
- [15] Clemetson J. K. (1996), *Platelets: a practical approach*, red. S. P. Watson, K. S. Authi, Oxford University Press, Oxford, 299-318.
- [16] Clemetson K. J. (1997), *Thromb. Haemost.*, **78**, 266-270.
- [17] Clemetson K. J. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 111-116.
- [18] Collier B. S., Anderson K., Weisman H. F. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 302-308.
- [19] Daviet L., McGregor J. L. (1996), *Platelets.*, **7**, 117-124.
- [20] Daviet L., McGregor J. L. (1996), *Platelets.*, **7**, 117-124.
- [21] Dean W. L., Chen D., Vanaman T. C. (1996), *Thrombin Causes Tyrosine Phosphorylation of Platelet Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase.*, *Platelets.*, **7**, 77(abtract).
- [22] Dembińska-Kieć A. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 177-188.
- [23] Du X., Ginsberg H. (1997), *Thromb. Haemost.*, **78**, 96-100.
- [24] Dutta-Roy A. K., Gordon M. J., Campbell F. M., Crosbie L. C. (1996), *Platelets*, **7**, 291-295.
- [25] Escolar G., Rao G. H., Nieuwenhuis H. K., White J. G. (1996), *Platelets*, **7**, 297-301.
- [26] Fitzgerald G. A., Healy C., Daugherty J. (1987), *Fed. Proc.*, **46**, 154-158.
- [27] Flores N. A. (1996), *Pharmacol. Ther.*, **72**, 83-108.
- [28] Fox J. E. B. (1996), *Haemostasis*, **26**, 102-131.
- [29] Friedlander G., Le Grimellec C., Amiel C. (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, **1022**, 1-7.
- [30] Frojmovic M. M., Kasirer-Friede A., Goldsmith H. L., Brown E. A. (1997), *Thromb. Haemost.*, **77**, 568-576.
- [31] Frojmovic M. M. (1996), *Platelets*, **7**, 9-21.
- [32] Gachet C. (1995), *Br. J. Haematol.*, **91**, 434-444.
- [33] Gachet C., Hechler B., Leon C., Vial C., Leray C., Ohlmann P., Cazenave J. (1997), *Thromb. Haemost.*, **78**, 271-275.
- [34] Gachet C., Hechler B., Leon C., Vial C., Ohlmann P., Cazenave J. P. (1996), *Platelets*, **7**, 261-267.
- [35] Gemmell C. H., Ramirez S. M., Yeo E. L., Sefton M. V. (1995), *J. Lab. Clin. Med.*, **125**, 276-287.
- [36] Geng J. G., Bevilacqua M. P., Moore K. L., McIntyre T. M., Prescott S. M., Kim J. M., Zimmerman G. A., McEver R.P. (1990), *Nature*, **343**, 757-760.
- [37] Giedrojć J. (1996), *Post. Hig. Med. Dosw.*, **50**, 265-276.
- [38] Ginsberg M. H., Du X., O Toole T. E., Loftus J. C. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 352-359.
- [39] Goto S., Handa S., Takahashi E., Abe S., Handa M., Ikeda Y. (1996), *Thromb. Res.*, **84**, 351-359.

- [40] Gulino D., Boudignon C., Zhang L., Concord E., Rabiet M. J., Marguerie G. (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**, 11001–11007.
- [41] Hartwig J. H. (1996), *Platelets*, **7**, 356–358.
- [42] Hawiger J. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 369–372.
- [43] Hoek J. B., Taraschi T. F., Rubin E. (1988), *Semin. Liver Dis.*, **36–48**.
- [44] Hoffman P. L., Tabakoff B. (1990), *FASEB J.*, **4**, 2612–2622.
- [45] Holmsen H. (1996), *Platelets*, **7**, 336–341.
- [46] Jamieson G. A. (1997), *Thromb. Haemost.*, **78**, 242–246.
- [47] Jansen B. O. (1996), *Platelets*, **7**, 345–346.
- [48] Jastrzębska M. (1995), *Diagn. Lab.*, **31**, 107–114.
- [49] Kamińska-Kaczmarek B. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 67–75.
- [50] Kawiak J. (1997), *Podstawy cytofizjologii*, red. J. Kawiak, J. Mirecka, M. Olszewska, J. Warchol, Warszawa, 392–404.
- [51] Kennedy S. D., Igarashi Y., Kickler T. S. (1997), *Am. J. Clin. Pathol.*, **107**, 99–104.
- [52] Kitagawa S., Hirata H. (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, **1112**, 14–18.
- [53] Klinker J. F., Wenzel-Seifert K., Seifert R. (1996), *Gen. Pharmacol.*, **27**, 33–54.
- [54] Klyszejko-Stefanowicz L. (1995), *Cytobiochemia*, Warszawa, 203–253.
- [55] Koerner K., Weihe R., Sahlmen P., Zeller B., Seifried E., Cardoso M., Kubanek B. (1995), *Ann. Hematol.*, **70**, 97–102.
- [56] Kolarov P., Tschoepe D., Nieuwenhuis H. K., Gries F. A., Strauer B., Schultheiss H. P. (1996), *Eur. Heart J.*, **17**, 1216–1222.
- [57] Konstantopoulos K., Grotta J. C., Sills C., Wu K. K., Hellums J. D. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 1329–1334.
- [58] Kopeć M. (1996), *Zakrzepy i zatory*, red. S. Łopaciuk, Warszawa, 15–38.
- [59] Kovacsos T. J., Hartwig J. H. (1996), *Blood*, **87**, 618–629.
- [60] Kralisz U. (1994), *Post. Bioch.*, **40**, 40–45.
- [61] Kroll M. H., Schafer A. I. (1995), *Immunopharmacology of Platelets*, red. M. Joseph, Harcourt Brace and Company, Acad. Press, 31–65.
- [62] Krzemińska-Pakuła M. (1996), *Zakrzepy i zatory*, red. S. Łopaciuk, Warszawa, 152–172.
- [63] Kwiatkowska-Korczak J. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 104–115.
- [64] Larsen E., Celi A., Gilbert G. E., Furie B. C., Erban J. K., Bonfanti R., Wagner D. D., Furie B. (1989), *Cell*, **59**, 305–312.
- [65] Lechi C., Androli G., Gaino S., Tommasoli G., Zuliani V., Ortolani R., Degan M., Benoni G., Bellavite P., Lechi A., Minuz P. (1996), *Thromb. Haemost.*, **76**, 791–798.
- [66] Leśniak W., Porembaska Z. (1993), *Budowa i funkcja błony komórkowej*, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa.
- [67] Lester D. S. (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, **1054**, 297–303.
- [68] Lester D. S., Baumann D. (1991), *Eur. J. Pharmacol.*, **206**, 301–308.
- [69] Lester D. S., Brumfeld V. (1990), *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 251–256.
- [70] Lester D. S., Brumfeld V. (1991), *Biophys. Chem.*, **39**, 215–224.
- [71] Lester D. S., Doll L., Brumfeld V., Miller I. R. (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, **1039**, 33–41.
- [72] Levy-Toledano S., Gallet C., Nadal F., Bryckaert M., Macclouf J., Rosa J. (1997), *Thromb. Haemost.*, **78**, 226–233.
- [73] Li R. Y., Gaitis F., Ragab-Thomas M. F., Macclouf J., Caen J. P., Levy-Toledano S., Chap H. (1997), *Thromb. Haemost.*, **77**, 150–154.

- [74] Macclouf J., Habib A. (1995), *Immunopharmacology of Platelets*, red. M. Joseph, Harcourt Brace and Company, Acad. Press, 195–208.
- [75] May J. A., Glenn J. R., Spangenberg P., Heptinstall S. (1996), *Platelets*, 7, 159–168.
- [76] McNicol A. (1996), *Platelets: a practical approach*, red. S. P. Watson, K. S. Authi, Oxford University Press, Oxford, 1–25.
- [77] Michelson A. D., Benoit S. E., Furman M. I., Barnard M. R., Nurden P., Nurden A. T. (1996), *Blood*, 87, 1396–1408.
- [78] Michelson A. D. (1996), *Blood*, 87, 4925–4936.
- [79] Michelson A. D., Barnard M. R. (1987), *Blood*, 70, 1673–1679.
- [80] Michelson A. D., Ellis P. A., Barnard M. R., Matic G. B., Viles A. F., Kestin A. S. (1991), *Blood*, 77, 770–778.
- [81] Moroi M., Jung S. M. (1997), *Thromb. Haemost.*, 78, 439–444.
- [82] Murakami T., Komiyama Y., Masuda M., Kido H., Nomura S., Fukuhara S., Karakawa M., Iwasaka T., Takahashi H. (1996), *Eur. J. Clin. Invest.*, 26, 996–1003.
- [83] Naik U. P., Kornecki E., Ehrlich Y. H. (1991), *Biochim. Biophys. Acta*, 1092, 256–264.
- [84] Nieuwenhuis H. K., van Oosterhout J. J. G., Rozemuller E., van Iwaarden F., Sixma J. J. (1987), *Blood*, 70, 838–845.
- [85] Nowak J. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 117–127.
- [86] Nurden P., Bihour C., Smith M., Raymound J. M., Nurden A. T. (1996), *Am. J. Hematol.*, 51, 79–84.
- [87] Olas B., Wachowicz B. (1995), *Post. Biol. Kom.*, 22, 359–379.
- [88] Phillips D. R., Baughan A. K. (1983), *J. Biol. Chem.*, 258, 10240–10246.
- [89] Phillips D. R., Charo I. F., Parise L. V., Fitzgerald L. A. (1988), *Blood*, 71, 831–843.
- [90] Plow E. F., Ginsberg M. H. (1989), *Progress in Haemostasis and Thrombosis*, red. B. S. Coller, Philadelphia, WB Saunders Co. 117–156.
- [91] Rendu F., Falet H. (1997), *Implication of protein tyrosine phosphatase SHP-1 during platelet activation*. *Thromb. Haemost.*, Suppl. 262 (abstract).
- [92] Renesto P., Chignard M. (1994), *J. Lab. Clin. Med.*, 123, 906–913.
- [93] Repasky E. A., Black J. D. (1996), *Current Topics in Membranes*, Academic Press, Inc. New York, 313–343.
- [94] Rinder C. S., Bohnert J., Rinder H. M., Mitchell J., Ault K., Hillman R. (1991), *Anesthesiology*, 75, 388–393.
- [95] Rittenhouse S. E. (1996), *Blood*, 88, 4401–4414.
- [96] Roald H. E., Sakariassen K. J. (1995), *Thromb. Haemost.*, 73, 126–131.
- [97] Rosenfeld S. J., Gralnick H. R. (1997), *Acta Haematol.*, 97, 118–125.
- [98] Ruggeri Z. (1997), *Thromb. Haemost.*, 78, 611–616.
- [99] Shattil S. J., Gao J., Kashiwagi H. (1997), *Thromb. Haemost.*, 78, 220–225.
- [100] Shattil S. J. (1995), *Thromb. Haemost.*, 74, 149–155.
- [101] Shattil S. J., Motulsky H. J., Insel P. A., Flaherty L., Brass L. F. (1986), *Blood*, 68, 1224–1231.
- [102] Shinitzky M. (1984), *Physiology of Membrane Fluidity*, vol. 1, red. M. Shinitzky, Plenum Press, New York, 1–51.
- [103] Siedlar M. (1992), *Pol. J. Immunol.*, XVII, 3–18.
- [104] Skangiel-Kramska J. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 45–61.

- [105] Sonnenberg A., Modderman P. W., Hogervorst F. (1988), *Nature*, **336**, 487–489.
- [106] Spence S., Houslay M. D. (1993), *Biochem. J.*, **291**, 945–949.
- [107] Stryer L. (1997), *Biochemia*, red. L. Stryer, Warszawa, 346–384.
- [108] Toyoda H., Nakai K., Omay S. B., Shima H., Nagao M., Shiku H., Nishikawa M. (1996), *Thromb. Haemost.*, **76**, 1053–1062.
- [109] Tschoepe D., Schultheib H. P., Koralov P., Schwippert B., Dannehl K., Nieuwenhuis H. K., Kahrel B., Strauer B., Gries F. A. (1993), *Circulation*, **88**, 37–42.
- [110] Vetulani J. (1995), *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, red. L. Konarska, Warszawa, 154–176.
- [111] Watała C., Golański J., Boncler M. A., Pietrucha T., Gwoździński K. (1998), *Platelets*, **9**, 315–327.
- [112] Woods V. L., Wolff L. E., Keller D. M. (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 15242–15251.
- [113] Yeo E. L., Sheppard J. A., Feuerstein I. A. (1994), *Blood*, **83**, 2498–2507.
- [114] Zawilska K. (1996), *Zakrzepy i zatory*, red. S. Łopaciuk, Warszawa, 141–151.

Instytut Kardiologii Akademii Medycznej
w Łodzi

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej
Akademii Medycznej w Łodzi

Jacek Golański, Cezary Watała

MOLECULAR MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION IN SELECTED RECEPTOR SYSTEMS OF BLOOD PLATELETS

This review paper concerns molecular mechanisms of signal transduction by various receptor systems and the role of various agonists in the activation of blood platelets. Authors present the physiological pathways leading to platelet activation and release reaction, as well as those responsible for the natural feedback inhibition of platelet activation. The significance of the conformational changes in platelet receptor glycoproteins, the reorganisation of platelet cytoskeleton, the mobilisation of calcium, processes of phosphorylation/dephosphorylation, and lipid bilayer fluidity in the modulation of the triggering of platelet signal transduction is discussed.