

STRUKTURA I AKTYWACJA PŁYTEK KRWI ORAZ ICH ZASTOSOWANIE JAKO KOMÓREK MODELOWYCH

BLOOD PLATELETS AS PHARMACOLOGICAL MODEL

Joanna SIKORA¹, Barbara KOSTKA²

¹Klinika Chorób Wewnętrznych z Oddziałem Farmakologii Klinicznej i Terapii Monitorowanej, ²Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Katedra Chemii Farmaceutycznej i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie Komórki i składniki krwi są szczególnie narażone na kontakt z substancjami w różny sposób wprowadzanymi do krwioobiegu, nawet tymi szybko metabolizowanymi i wydalnymi. Płytki krwi, mimo że nie posiadają jądra komórkowego, są wysoce zorganizowanymi, bogatymi w liczne organelle komórkami. Reagują sekrecją aktywnych związków zmagazynowanych w specyficznych ziarnistościach nawet na bardzo małe ilości krążących molekuł. Dlatego płytka krwi od lat jest wykorzystywana jako komórka modelowa w badaniach farmakologicznych leków. Dotyczy to nie tylko badań hemostazy, ale także innych komórek, np. neuronów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Praca ta przedstawia główne informacje dotyczące budowy, aktywacji (i metod jej oceny) oraz wykorzystania płytek krwi jako modelu farmakologicznego.

Słowa kluczowe: płytki krwi, receptory płytkowe, metody pomiaru aktywacji płytek krwi, model farmakologiczny

Summary: Blood cells are exposed to any agent absorbed or injected into the bloodstream, even those rapidly metabolised and extracted. Although anucleated, blood platelets are highly organized cells, rich in different types of organelles. They respond to small amounts of circulating molecules by secreting a number of active compounds stored in specific granules. That's the reason blood platelets are used as pharmacological model for new drugs evaluation for many years. The use of platelets as models has not only been confined to coagulation assay but also has extended to other cell types like: neuronal cells and vascular smooth muscle cells. This review presents the main information about structure of blood platelets, their activation, methods for monitoring of their function and using platelets as pharmacological model.

Keywords: platelets, platelet receptors, platelet function assays, pharmacological model

STRUKTURA I FUNKCJA PŁYTEK KRWI

Płytki krwi (PK) to najmniejsze, niemające jąder elementy morfotyczne krwi obwodowej i szpiku. Są fragmentami cytoplazmy megakariocytów szpiku kostnego i płuc. Prawidłowe płytki krwi mają kształt dyskooidalny, średnicę $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ i objętość $7,06 \pm 4,85 \mu\text{m}^3$. Ich liczba u zdrowych osób wynosi $140\text{--}440 \cdot 10^9/\text{L}$. PK przeżywają od 8 do 12 dni i są usuwane z krwioobiegu przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Około 30% całkowitej masy PK znajduje się w śledzionie, stanowiąc tzw. pulę wymienialną [17].

PK są niezwykle reaktywnymi komórkami reagującymi na bardzo małe ilości krążących molekuł sekrecją aktywnych związków zmagazynowanych w ziarnistościach. Dlatego PK są często wykorzystywane jako model do badań wyspecjalizowanych komórek sekrecyjnych, chociaż w przeciwieństwie do nich same nie syntetyzują związków znajdujących się w ziarnistościach. Struktury wewnątrzkomórkowe, takie jak: podbłonowy system kanalików okrążających, system kanalików gęstych, pojedyncze mitochondria, ziarna glikogenu będące źródłem energii, nieliczne struktury aparatu Golgiego oraz liczne specyficzne ziarnistości są rozproszone w cytoplazmie PK [37]. Za utrzymanie dyskooidalnego kształtu płytki oraz jego zmiany podczas aktywacji odpowiedzialny jest cytoszkielet płytkowy [22]. Podstawowym składnikiem cytoszkieletu są α - i β -tubulina, polimery aktyny oraz liczne białka pośredniczące w ich łączeniu [17].

W układzie kanalików gęstych magazynowane są jony wapniowe oraz liczne enzymy, m.in. kierujące przemianami kwasu arachidonowego. Struktury te pełnią istotną rolę w kontroli aktywacji PK [11].

Błona komórkowa składa się z dwóch warstw lipidów: zewnętrznej i wewnętrznej (najliczniejsze są fosfolipidy, a w wewnętrznej warstwie występuje również cholesterol). W błonie rozmieszczone są białka, które mogą przechodzić przez obie warstwy. Wówczas zewnętrzne końce cząstek wiążą się z oligosacharydami i wytwarzają glikoproteiny. Są to receptory dla czynników wpływających na funkcję PK, zawierają kanały jonowe oraz pełnią funkcje enzymów. Powierzchnia błony pokryta jest amorficznym płaszczem – glikokaliksem, który dzięki resztom kwasu sjałowego białek i lipidów ma ujemny ładunek elektryczny [22].

Ziarnistości wewnątrzpłytkowe są miejscem magazynowania wielu składników biologicznie czynnych, które są uwalniane do otaczającego środowiska podczas aktywacji PK [11] (tab. 1).

AKTYWACJA PŁYTEK KRWI

Aktywacja PK może nastąpić w wyniku adhezji do elementów macierzy pozakomórkowej w miejscu uszkodzenia ściany naczynia krwionośnego, albo też pod wpływem różnorodnych substancji – agonistów (np. trombiny, ADP, tromboksanu A_2). W przypadku wysokiego modułu ścinania, który charakteryzuje przepływ krwi w drobnych naczyniach, niezbędnym spoiwem między PK a białkami macierzy

TABELA 1. Składniki ziarnistości wewnątrzpłytkowych [35]

Ziarnistości gęste "czynniki pro- agregacyjne"	α -ziarnistości – "czynniki adhezyjne i naprawcze"	Lizosomy "czynniki oczyszczające"
Nukleotydy Adeninowe: ADP, ATP Guaninowe: GDP, GTP Aminy Serotonina (5-HT) Histamina Jony dwuwartościowe: wapń magnez Fosfoinozytole	Proteoglikany: Swoiste białka PK: PF4 (czynnik płytkowy 4) β TG (β -tromboglobulina); glikoproteiny bogate w serynę Białka adhezyjne: fibronektyna, czynnik von Willebranda, trombospondyna, witronektyna Białka czynne w krzepnięciu krwi i fibrynolizie: fibrynogen, czynniki: V, VII, XI, XII, kininogen, białko S, plazminogen, t-PA Mitogeny: PDGF (czynnik wzrostu pochodzący z płytek), ECGF (cz. wzrostu komórek śródbłonna), IGF (insulinopodobny cz. wzrostu), interleukina β Inhibitory proteaz: α_2 -makroglobulina, α_2 -antytrypsyna, inhibitor kolagenaz, α_2 -antypłazmina, PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu), C1-inhibitor Białka błony ziarnistości: P-selektyna, białko-33 (GMP-33), GP IIb-IIIa, GP Ib-IX, GP IV (CD36), GP V, CD 9, osteonektyna, Rap 1 Immunoglobuliny: IgG, IgA, IgM Albuminy	Kwaśne hydrolazy Katepsyna D, E Karboksypeptydazy Kolagenazy Kwaśne fosfatazy Glikohydrolazy

pozakomórkowej jest czynnik von Willebranda. Adhezja PK do struktur podśródbłonkowych, np: kolagenu czy fibronektyny, podobnie jak związanie agonistów z receptorami, uruchamia wewnątrzkomórkowe systemy przesyłania sygnałów aktywujących [19]. Płytki przechodzą wówczas ze stanu spoczynku w stan aktywny, co we wczesnej fazie można stwierdzić obserwując zmianę ich kształtu z dyskooidalnego na nieregularny z licznymi wypustkami. Ten pierwszy, najwcześniejszy etap jest uważany za nieodzowny dla prawidłowego przebiegu procesu aktywacji płytek krwi [2, 32]. Informacja o aktywacji w płytce, która ulega adhezji, może zostać wzmocniona dzięki przyłączeniu cząstek agonistów do receptorów PK. Przesyłane są wówczas dodatkowe sygnały. W PK aktywowanych obserwujemy zmiany metabolizmu, architektury cytoszkieletu, a także translokację białek i aktywację receptorów integrynowych. Umożliwia to ich adhezję, agregację i uwolnienie substancji biologicznie aktywnych ziarnistości, a także udział w retrakcji skrzepu [19].

ROLA RECEPTORÓW PŁYTKOWYCH W AKTYWACJI PK

Harmonijne funkcjonowanie organizmu oparte jest na nieustannym porozumiewaniu się jego komórek, polegającym na wysyłaniu i odbieraniu różnorodnych informacji. Główną rolę w przypadku PK odgrywają substancje sygnałowe, które nie wnikają do komórek, ale wiążą się z błonowymi receptorami uruchamiając w ten sposób kaskadę

zdarzeń, w wyniku, której dochodzi do końcowego efektu biologicznego [28]. W łańcuchu przekazywania sygnału, zainicjowanego przez powierzchniowy receptor biorą udział:

- 1) enzymy efektorowe, tj. cyklaza adenylanowa i guanylanowa, fosfolipaza C, fosfolipaza A₂, 3-kinaza fosfatydyloinozytolowa (PI 3-K), kinazy tyrozynowe białek (PTK) [25];
- 2) wtórne przekaźniki informacji, tzn. cAMP [1], cGMP, DAG, IP₃, Ca²⁺, ikozanoidy;
- 3) efekторы wewnętrzne (enzymy docelowe: kinazy białkowe C, G, A) [37].

Ze względu na budowę i mechanizm działania receptory płytkowe możemy podzielić na dwie grupy: receptory transbłonowe oraz receptory białek adhezyjnych.

Receptory transbłonowe – sprzężone i współpracujące z heterodimerycznymi białkami G – są zbudowane z siedmiu transbłonowych domen tzw. receptorów serpentynowych (metabotropowych). Druga i trzecia pętla oraz C-koniec receptora uważane są za najistotniejsze miejsca oddziaływania białka receptorowego z różnymi rodzajami białek G. Do tej grupy należą receptory dla trombiny, ADP, prostanoidów (TXA₂, PGE₂, PGI₂), fosfolipidów. Również przez te receptory mogą potęgować aktywację PK serotonina i adrenalina, ale same nie są „pełnymi” płytkowymi agonistami [26].

Ostatnio odkryto, że receptor CD47 (IAP – ang. *integrin associated protein*), którego ligandem jest trombospondyna, jest zbudowany z pięciu domen transbłonowych. Mechanizm aktywacji PK z udziałem CD47 nie jest jasny, ale wiadomo, że receptor ten jest sprzężony z heterodimerycznym białkiem G_i [25].

Niezwykle interesujące są receptory serpentynowe PAR (ang. *proteolytically activated receptor*), połączone z heterodimerycznymi białkami G (G_q, G_i i G₁₂/G₁₃), dla jednego z najsilniejszych płytkowych agonistów – trombiny. Na ludzkich płytkach stwierdzono obecność receptorów PAR-1 wrażliwych tylko na niskie dawki trombiny oraz PAR-4 reagujące na wysokie jej stężenia. Trombina jedynie w formie a stymuluje krwinki płytkowe, m.in. poprzez unikatowy proteolityczny rozpad receptora PAR. W długiej N-końcowej domenie pozakomórkowej receptora znajduje się silnie kwaśna sekwencja, do której przyłącza się trombina, a następnie powoli odcina 41-aminokwasowy odcinek tej zewnątrzkomórkowej domeny. Odsłonięty w ten sposób nowy N-koniec receptora pełni rolę agonisty i to on wyzwala odpowiedź PK na trombinę [23, 37].

Ze względu na duże znaczenie adenosynodifosforanu (ADP) w aktywacji PK należałoby wyróżnić wśród tej grupy receptory purynowe. ADP pomimo stosunkowo słabych efektów działania (w porównaniu z innymi agonistami) odgrywa kluczową rolę w prawidłowym przebiegu procesu aktywacji płytek krwi [13]. Jest czynnikiem autokrynnym magazynowanym w wysokich stężeniach w ziarnistościach gęstych płytek krwi i uwalnianym z nich w przebiegu procesu sekrecji zachodzącej pod wpływem innych agonistów [12, 39]. Inhibitory płytkowych receptorów dla ADP są skutecznymi lekami przeciwplatekowymi stosowanymi we wtórnej prewencji epizodów niedokrwienych (Tiklopidyna i Kłopidogrel) [27, 41, 42]. Natomiast u pacjentów ze stwierdzonymi defektami receptorów dla ADP obserwuje się występowanie skaz krwotocznych [4, 5].

Jak dotąd udowodniono istnienie trzech receptorów płytkowych dla ADP. Są to dwa receptory serpentynowe: P2Y₁ [9] i P2T_{AC} oraz jeden receptor jonotropowy P2X₁ [7, 18, 20, 46]. ADP po przyłączeniu do receptora P2Y₁ aktywuje fosfolipazę C (PLCβ2/

b2) z udziałem heterodimerycznych białek Gq α , powodując hydrolizę 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂) do wtórnych przekazników informacji: 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP₃) i 1,2-diacylglicerolu (DAG). IP₃ łączy się ze swoistymi receptorami trisfosfoinozytolowymi (RI), o naturze kanałów wapniowych, obecnymi w błonach systemu kanalików o dużej gęstości. Prowadzi to do uwolnienia jonów wapnia do cytozolu. Uwolniony Ca²⁺ pobudza receptory rianodinowe (RR), które po aktywacji powodują dalsze uwalnianie Ca²⁺ z siateczki śródplazmatycznej (narastanie fali wapniowej). Jony wapniowe są następnie wiązane przez kalmodulinę, która fosforyluje liczne białka enzymatyczne powodując ich aktywację (m.in. kinazy białkowe). Natomiast DAG aktywuje białkową kinazę C (PKC), która jest enzymem odpowiedzialnym za przeniesienie fosforanu z ATP na serynę lub treoninę odpowiednich białek w obecności jonów wapnia i fosfatydyloseryny. Prowadzi to ostatecznie do uwolnienia zawartości ziarnistości wewnątrzkomórkowych. Receptor P2T_{AC} połączony jest z białkiem G_i i na skutek jego aktywacji pod wpływem ADP dochodzi do inhibicji cyklazy adenylanowej (AC) i zmniejszenia stężenia cAMP. P2X1 jest receptorem jonotropowym, którego pobudzenie wywołuje gwałtowny napływ jonów wapnia z zewnątrz. Ostatnio wykazano, że jego pobudzenie skutkuje zmianą kształtu płytek krwi [38].

Struktura receptorów dla białek adhezyjnych pozwala zaliczyć je do rodzin: integryn, selektyn i immunoglobulin. Do tej grupy należą również GPI-IX i GPIV reagujące odpowiednio z czynnikiem von Willebranda i trombospondyną.

Receptory integrynowe ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, $\alpha_{\text{v}}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_5$) są grupą o największym znaczeniu w aktywacji PK, najobficiej w nich występują i są najlepiej poznane.

Integryna $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb-IIIa) uzyskuje właściwości receptorowe dopiero po aktywacji PK, w wyniku konformacyjnej zmiany cząsteczki. Podstawową rolą $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ jest udział w procesie agregacji PK zachodzącej pod wpływem wszystkich fizjologicznych agonistów oraz w retrakcji skrzepu. Mechanizm jej działania polega na wiązaniu białek adhezyjnych zawierających sekwencje RGD (Arg-Gly-Asp). Są to: fibrynogen, fibronektyna, witronektyna i czynnik von Willebranda. Integryna ta przyczynia się również do gromadzenia w płytkowych ziarnistościach α osoczonego fibrynogenu. Fizjologiczne znaczenie integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb-IIIa) w procesie hemostazy obrazuje skaza krwotoczna spowodowana jej ilościowym bądź jakościowym defektem – trombastenia Glanzmanna. Z drugiej strony inhibitory integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb-IIIa) znajdują coraz większe zastosowanie w leczeniu przeciwzakrzepowym [41]. Należą do nich monoklonalne przeciwciała np. 7E3 – ReoPro – abciximab [6] i drobnocząsteczkowe peptydy o działaniu antagonistycznym zawierające sekwencje RDG – Integrelin, Tirofiban, Lamifiban, Xemlofiban i inne [48, 31].

Integryna $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ (GP Ic-IIa) jest obecna w PK, komórkach śródbłonna naczyniowego, komórkach mięśni gładkich, fibroblastach i osteoblastach. Jest receptorem witronektyny, fibrynogenu, czynnika von Willebranda, trombospondyny, osteospondyny i prawdopodobnie kolagenu. Obniżoną jej ilość stwierdzono w trombastenii Glanzmanna.

Integryna $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia-IIa) odpowiada za adhezję PK do kolagenu typu I-VIII, przy czym niezbędny jest tu udział jonów magnezu. Jony wapniowe hamują ten proces. Defekty w działaniu tej integryny objawiają się zazwyczaj jako łagodne skazy krwotoczne (agregacja występuje pod wpływem wszystkich agonistów z wyjątkiem kolagenu).

TABELA 2. Wybrane metody badania aktywacji i reaktywności poszczególnych faz pobudzenia PK (wg [13])

Przejaw aktywacji PK	Metody badania aktywacji i reaktywności
TRANSDUKCJA SYGNAŁU	Fosforylacja/defosforylacja – <i>western blotting</i>
REORGANIZACJA CYTOSZKIELETU	Wiązanie fallicidyny do F-aktyny cytoszkieletu
AKTYWACJA RECEPTORÓW BŁONOWYCH	Spectroscopia EPR Spektrofluorometriacytometria
ZMIANA KSZTAŁTU	Metoda optyczna
AKTYWNOŚĆ PROKOAGULACYJNA	Zmiana asymetrii lipidowej błon Wiązanie aneksyny V
METABOLIZM AA	Zmiany stężenia tromboxanu-TxB ₂
ADHEZJA	Metody kolorymetryczne i komorowe Analizatory przepływowe typu <i>point-of-care</i> *
REAKCJA UWALNIANIA	Immunoenzymatyczne metody oznaczania białek uwalnianych z ziarnistości α (selektyna P, β -tromboglobulina, PF-4, PAI-I wewnątrzpłytkowy), z ziarnistości gęstych (serotonina) z lizosomów (GP-53) Mobilizacja jonów wapnia (ziarnistości gęste) ATP (lucyferyna – lucyferaza)
AGREGACJA	Metody turbidymetryczne Metoda impedancyjny Acytometria przepływowa Metody ubytkowe Agregometria laserowa
*analizatory przepływowe typu <i>point-of-care</i> są półilościowe, oceniają zarówno proces adhezji, jak i agregacji	

Integryna $\alpha_3\beta_1$ (GP Ic-IIa) jest receptorem fibronektyny, niezależnym od aktywacji PK, warunkuje też tzw. rozpostarcie PK na powierzchni pokrytej fibronektyną.

Integryna $\alpha_6\beta_1$ (GP Ic-IIa) jest receptorem lamininy występującym na PK i wielu innych komórkach. Adhezja PK do lamininy jest zależna od obecności jonów magnezu, manganu i kobaltu [31, 48].

METODY POMIARU AKTYWACJI I REAKTYWNOŚCI PK

Pomiar aktywacji PK pozwala wnioskować o ich pobudzeniu wewnątrzustrojowym, czyli o stanie płytki przed wynaczynieniem krwi. Reaktywność to odpowiedź PK na działanie agonistów lub sił ścinających w warunkach *ex vivo*, określana na podstawie

parametrów aktywacji płytek. Należy zwrócić szczególną uwagę na wyjątkową wrażliwość PK, a co za tym idzie duże ryzyko wystąpienia niepożądanego aktywacji w czasie pobierania i preparatyki krwi [14, 15]. Dlatego tak ważne jest odpowiednie pobranie krwi i właściwy dobór antykoagulantów. Niestety w praktyce nie jest możliwe uzyskanie PK, które nie uległy przynajmniej minimalnej niepożądanego aktywacji w czasie pobierania i przygotowania do właściwego oznaczenia [44].

Ze względu na złożoność procesów aktywacji PK nie istnieje jedno, uniwersalne badanie testujące całkowitą sprawność hemostatyczną PK. Każdą z faz aktywacji PK można badać za pomocą kilku alternatywnych metod (tab. 2) [33, 36].

PŁYTKA KRWI JAKO KOMÓRKA MODELOWA

Komórki i składniki krwi są szczególnie narażone na kontakt ze wszystkimi substancjami w różny sposób wprowadzanymi do krwioobrotu, nawet tymi szybko metabolizowanymi i wydalnymi [3]. Nowosyntetyzowane związki chemiczne, preparaty otrzymywane z produktów naturalnych [46] czy też nowe analogi znanych leków są przed podjęciem prób klinicznych poddawane wielostopniowej ocenie w badaniach przesiewowych *in vitro* i *in vivo*. [30]. Różne strategie badawcze oraz stosowanie w nich różnych modeli doświadczalnych pozwalają na lepsze poznanie biologii procesu chorobowego, co w konsekwencji prowadzi do poszukiwań nowych leków i strategii terapeutycznych [40]. Zgodnie z definicją – „...*model doświadczalny winien być układem możliwie zbliżonym do układu badanego, ale prostszym i łatwiej dostępnym*” [29].

Dzięki swej skomplikowanej strukturze [22] płytka krwi od lat jest wykorzystywana jako komórka modelowa w badaniach farmakologicznych leków [34]. Dzięki temu można zredukować eksperymenty na zwierzętach i hodowlach komórkowych. Dotyczy to nie tylko badań hemostazy, ale poprzez analogie w budowie, także innych komórek, np. neuronów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [24]. Oczywiście między płytką krwi a neuronem istnieją znaczne różnice, ale pewne elementy PK, jak mechanizmy magazynowania i uwalniania serotoniny, receptory płytkowe dla neurotransmiterów (serotoniny, wazopresyny, receptory α_2 - i β -adrenergiczne) oraz obecność niektórych enzymów (np. monoaminooksydazy MAO) pozwalają wykorzystać je do badań przesiewowych leków stosowanych w schorzeniach neurologicznych [10, 38]. Również na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych i komórkach płytek krwi znajdują się receptory dla tych samych neurotransmiterów. Ich stymulacja wywołuje podobne reakcje w obu typach komórek, tj. zmianę kształtu PK i skurcz mięśni naczyń krwionośnych [43]. W procesach tych pośredniczą takie same przekaźniki – metabolity fosfatydyloinozytoli i jony wapnia [34, 24].

Wielką zaletą płytek krwi jest ich dostępność i to, że w przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, często wykorzystywanych w badaniach farmakologicznych, są one reprezentatywne dla człowieka [24].

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKKERMAN JWN. Inhibition of platelet functions by cyclic 3',5'AMP. *Platelets* 1996; **7**: 342–344
- [2] BAUER M, MASCHBERGER P, QUEK L i wsp. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 331–340.
- [3] BLOOM JC: Principles of hematotoxicology: laboratory assessment and interpretation of data. *Toxicol Pathol* 1993; **2**: 130–134.
- [4] CATTANEO M, GACHET Ch. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 2281–2285.
- [5] CATTANEO M, LECCHI A, LOMBARDI R i wsp. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2_{CYC} receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A₂ production and normal granule stores. Further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2_{CYC} receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 101–106.
- [6] COLLET JP, MONTALESCOT G, LESTY C i wsp. Disaggregation of in vitro preformed platelet-rich clots by abciximab increases fibrin exposure and promotes fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 142–148.
- [7] DANIEL JL, DANGELMAIER C, JIN J i wsp. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2024–2029.
- [8] DASKALOPOULOU SS, STANSBY G, MIKHAILIDIS DP. Clopidogrel and vascular disease prevention. *Curr Med Res Opin* 2004; **20**, 11: 1835–1838.
- [9] ECKLY A, GENDRAULT J-L, HECHLER B i wsp.: Differential involvement of the P2Y₁ and P2Y₁ receptors in the morphological changes of platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 694–701.
- [10] FERRARESE C, ZOIA C, PECORA N i wsp. Reduced platelet glutamate uptake in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1999; **106**: 685–692.
- [11] FOX JEB: Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 198–213.
- [12] GACHET C, HECHLER B, LÉON C i wsp. Purinergic receptors on blood platelets. *Platelets* 1996; **7**: 261–267.
- [13] GACHET C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 222–232.
- [14] GOLĄŃSKI J, WATAŁA C. Instrumentalne metody badania aktywacji i reaktywności płytek krwi-metody typu Point-of-Care. *Diagn Lab*. 2002; **38**: 211–222.
- [15] GOLĄŃSKI J, WATAŁA C. Znaczenie procesu aktywacji płytek krwi in vivo oraz in vitro w wybranych zagadnieniach praktyki klinicznej i diagnostyce laboratoryjnej. *Diagn Lab* 1999; **35**: 511–527.
- [16] HARRISON. Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005; **19**: 111–123.
- [17] HARTWIG J, ITALIANO J. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1580–1586.
- [18] HOYLAERTS MF, OURY C, TOTH-ZSAMBOKI E i wsp. ADP receptors in platelet activation and aggregation. *Platelets* 2000; **11**: 307–309.
- [19] JANIĄK A, CIERNIEWSKI CS: Wczesne fazy aktywacji płytek. *Acta Haemat Pol* 1997; **28**: 15–29.
- [20] JIN J, QUINTON TM, ZHANG J i wsp. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and ADP receptors. *Blood* 2002; **99**: 193–198.
- [21] KAMATH S, BLANN AD, Lip gyh. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* 2001; **22**, 17: 1561–1571.
- [22] KOPEĆ M, ŁOPACIUK S. Hemostaza fizjologiczna. [w] Łopaciuk S [red] Zakrzepy i zatory. PZWL, Warszawa 2002: 19–28.
- [23] KOPEĆ M. Różnorodne i zmienne funkcje trombiny. *Acta Haemat Pol* 1997; **28**: 95–99
- [24] MANGANO RM, SCHWARCZ R. The human platelet as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate. *J Neurochem* 1981; **36**: 1067–1076.
- [25] MAUCO G. Phosphoinositide metabolism. Phosphatidylinositol 3-kinaze. *Platelets* 1996; **7**: 341–342.
- [26] MIKKELSEN H. Synergism and autocrine regulation of agonist – induced platelet responses. *Platelets* 1996; **7**: 344–345.
- [27] MULLER C, BUTTNER HJ, PETERSEN J i wsp. A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 2000; **101**, 6: 590–594.

- [28] OLAS B. Udział heterodimerycznych białek G w przekazywaniu sygnałów w płytkach krwi. *Acta Haematol Pol* 2001; **32**: 393–405.
- [29] OPOLSKI A. Ocena przydatności modeli doświadczalnych w badaniach nad nowymi strategiami terapii przeciwnowotworowej. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Wrocław 2000
- [30] PARCHMENT RE, GORDON M, GRIESHABER CK i wsp. Predicting hematological toxicity (myelosuppression) of cytotoxic drug therapy from in vitro tests. *Ann Oncol* 1998; **9** (4): 357–364.
- [31] PATEL D, VÄÄNÄNEN, JIROUŠKOVÁ M i wsp. Dynamics of GP IIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro revealed by videomicroscopy. *Blood* 2003; **101**: 929–936.
- [32] PAUL BZS, DANIEL JL, KUNAPULI SP. Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J Biol Chem* 1999; **274**: 28293–28300
- [33] PEERSCHKE EI. The laboratory evaluation of platelet dysfunction. *Clin Lab Med* 2002; **22**: 405–420.
- [34] PLETSCHER A. Platelets as models: Use and limitations. *Experientia* 1988; **44**: 152–155.
- [35] QUINN MJ, FITZGERALD DJ. Ticlopidine and Clopidogrel. *Circulation* 1999; **100**: 1667–1672.
- [36] RAND ML, LEUNG R, PACKHAM MA. Platelet function assays. *Transfus Apheresis Sci* 2003: 307–317.
- [37] RENDU F, BROHARD-BOHN B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; **12**: 261–273.
- [38] ROLF MG, BREARLEY CA, MAHAUT-SMITH MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X₂ purinoceptors with α,β -Methylene ATP. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 303–308.
- [39] SAVAGE B, CATTANEO M, RUGGERI ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol* 2001; **8**: 270–276.
- [40] SILVER H, YODIM MB. MAO-A and MAO-B activities in rat striatum, frontal cortex and liver are unaltered after long-term treatment with fluvoxamine and desipramine. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2000 Mar; **10**: 125–128.
- [41] TANIUCHI M, KURZ HI, LASALA JM. Randomized comparison of ticlopidine and clopidogrel after intracoronary stent implantation in a broad patient population. *Circulation* 2001; **104**, 5: 539–543.
- [42] URBANO LA, BOGOUSLAVSKY J. Antiplatelet drugs in ischemic stroke prevention: from monotherapy to combined treatment. *Cerebrovasc Dis* 2004; **17**: 74
- [43] VOGEL GH: Strategies in drug discovery and evaluation. [w] Vogel GH [red] Drug Discovery and evaluation. Pharmacological Assays. Springer-Verlag 2002.
- [44] WATAŁA C, GOLĄŃSKI J. Postępy w metodach badania aktywacji płytek krwi – trudności i ograniczenia. *Acta Haematol Pol* 1999, **30**, 117–125.
- [45] WEBER AA, NEUHAUS T, SEUL C i wsp. Biotransformation of glyceryl trinitrate by blood platelets as compared to vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1996; **309**: 209–213.
- [46] WILDE JI, RETZER M, SIESS W i wsp. ADP-induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation. *Platelets* 2000; **11**: 286–295.
- [47] YAZDANPARAST R, MIANABAD I. The effect of the active component of *Dendrostella lessertii* on the adhesive property of human platelets and HL-60 cells. *Life Sci* 2004; **75**(6): 733–739.
- [48] ZAWILSKA K. Receptory płytek krwi dla białek adhezyjnych i ich anomalie. *Acta Haematol Pol* 1997; **28**: 15–24.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano 27.01.2005 r.

Przyjęto: 04.07.2005 r.

ul. Kniaziewicza 1/5; szpital im. Wł. Biegańskiego B I prawa; 91-347 Łódź

e-mail: jsikora@forweb.pl

