

ROLA TIOLI W AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

THE ROLE OF THIOLS IN BLOOD PLATELET ACTIVATION

Kamil KAROLCZAK, Beata OLAS, Joanna KOŁODZIEJCZYK

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Związki tiolowe obecne w komórkach można podzielić na niskocząsteczkowe i białkowe. Grupy tiolowe białek, pochodzące od cysteiny, mogą występować jako wolne tiole, disulfidy i mieszane disulfidy w połączeniu z niskocząsteczkowymi tiolami: glutationem, cysteiną, homocysteiną i γ -glutamylcysteiną. Reakcje związane z metabolizmem tioli spełniają ważną rolę w funkcjonowaniu płytek krwi, bezjądrzastych komórek pochodzących z megakariocytów i pełniących istotną funkcję w hemostazie. Różne niskocząsteczkowe tiole (glutathion, cysteina, cysteinyloglicyna, homocysteina oraz jej tiolakton) oraz zmiany potencjału redoks płytek krwi odgrywają szczególną rolę w różnych etapach aktywacji płytek krwi, ekspozycji receptorów na powierzchni komórek i transdukcji sygnałów. Ponadto, na zewnętrznej powierzchni błony płytek krwi występuje izomeraza białkowych disulfidów, która bierze udział w aktywacji płytek, w tym w aktywacji integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ i w tworzeniu agregatów płytkowych. W prezentowanej pracy przeglądowej opisano działanie wybranych niskocząsteczkowych tioli (glutathionu, homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny) w płytkach krwi.

Słowa kluczowe: płytki krwi, tiole, aktywacja.

Summary: Thiols exist as low-molecular-weight thiols and protein thiols in cells. Thiol groups in proteins can be present as free thiols, disulfides and mixed disulfides when conjugated with glutathione, cysteine, homocysteine, γ -glutamylcysteine. Blood platelets, enucleate cells derived from megakaryocytes and functioning in haemostasis, and reactions in platelets involving thiol groups metabolism play an important role in platelet functions. Different low-molecular-weight thiols (glutathione, cysteine, cysteinyloglycine, homocysteine and its thiolactone) and changes of redox potential of platelets play an essential role in various steps of platelet activation, the exposure receptors on platelet surface, and signal transduction. Moreover, protein disulfide isomerase was found on the platelet surface, where it appears to play an important role in the platelet activation, including the exposure of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and blood platelet aggregation. This review outlines current knowledge of different low-molecular-weight thiols (particularly glutathione, homocysteine and homocysteine thiolactone) action on blood platelets.

Key words: blood platelets, thiols, activation.

Wykaz skrótów: **AA** – kwas arachidonowy; **Cys** – cysteina; **ERP** (ang. *Endoplasmic Reticulum Protein*) – białko o aktywności izomerazy tiolowej; **GSH** – glutathion w formie zredukowanej; **GSNO** – S-nitrozo-glutathion; **GSSG** – glutathion w formie utlenionej; **Hcys** – homocysteina; **12-HETE** – kwas 12-hydroksyeikozatetraenowy; **HHcys** – hiperhomocysteinemia; **12-HPETE** – kwas 12-hydroperoksyekozatetraenowy; **HTL** – tiolakton homocysteiny; **NSH** – niskocząsteczkowe tiole; **NOS** – syntaza tlenu azotu;

ONOO⁻ – nadtlenoazotyn; **PAF** (ang. *Platelet Activating Factor*) – czynnik aktywujący płytki krwi; **PDI** (ang. *Protein Disulfide Isomerase*) – izomeraza białkowych disulfidów; **PGG₂** – prostaglandyna PGG₂; **PLA₂** – fosfolipaza A₂; **PLC** – fosfolipaza C; **PSH** – białkowe tiole; **RFA** – reaktywne formy azotu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **TXA₂** – tromboksan A₂.

WSTĘP

Płytki krwi są fragmentami bardzo dużych komórek – megakariocytów, powstających w szpiku kostnym. Średnio w 1 ml krwi znajduje się 250 tysięcy płytek. Ich czas „przeżycia” wynosi 8–10 dni. Płytki krwi odgrywają bardzo istotną rolę w procesie hemostazy (m.in. w hamowaniu krwawienia). Płytki mogą być aktywowane przez szereg agonistów włączając czynnik koagulacyjny (trombinę), hormony (epinefrynę, wazopresynę), niskocząsteczkowe związki (serotoninę, difosforan adenozyne – ADP), pochodne lipidowe (czynnik aktywacji płytek – PAF, tromboksan A₂) i inne związki białkowe (kolagen). Reakcją płytek na różne aktywatory jest adhezja, zmiana kształtu, agregacja i wydzielanie różnych substancji zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych [45, 71]. Aktywacja płytek krwi przez agonistę może także prowadzić do produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) czy azotu (RFA) [40, 61, 83]. Tak więc aktywacja płytek związana jest z uruchamianiem wielu procesów fizjologicznych i patologicznych włączając trombozę, choroby serca, arteriosklerozę czy choroby nowotworowe.

Stosując znaczniki grup tiolowych, takie jak PCMB (sulfonian p-chlorortęcio-benzoowy) lub DTNB (kwas 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoowy) zidentyfikowano na powierzchni płytek krwi różnorodne klasy tioli zaangażowanych w odpowiedź płytek krwi na działanie agonistów [15]. Stwierdzono, że aktywacji, w tym agregacji płytek krwi, towarzyszy znaczny wzrost stężenia wolnych grup tiolowych na powierzchni błony komórkowej. Ocenia się, że na powierzchni zaktywowanych płytek krwi prezentowanych jest aż o 460% więcej wolnych grup tiolowych (–SH) niż na powierzchni płytek spoczynkowych. Znacznie mniejsza ekspozycja wolnych grup tiolowych (60%) występuje na powierzchni płytek pobudzonych, które jednak nie rozpoczęły jeszcze procesu agregacji. Zaproponowano dwie hipotezy tłumaczące to zjawisko:

- 1 – Aktywacji płytek towarzyszy redukcja mostków disiarczkowych.
- 2 – Na powierzchni ujawniają się grupy tiolowe wcześniej ukryte [6, 15].

Nie wykluczone, że zaangażowana jest w to płytkowa izomeraza tiolowa, której status redoks również się zmienia wraz ze zmianą funkcjonalnego stanu płytek. 81% cząsteczek tego enzymu znajduje się w konformacji zredukowanej na płytkach aktywowanych/agregujących, a na płytkach spoczynkowych jedynie 26% cząstek enzymu przyjmuje taką konformację [6, 15].

W niniejszym artykule przeglądowym opisano rolę związków tiolowych w aktywacji płytek krwi, która nie jest w pełni poznana i jest zagadnieniem budzącym wiele kontrowersji.

CHARAKTERYSTYKA BIAŁKOWYCH TIOLI

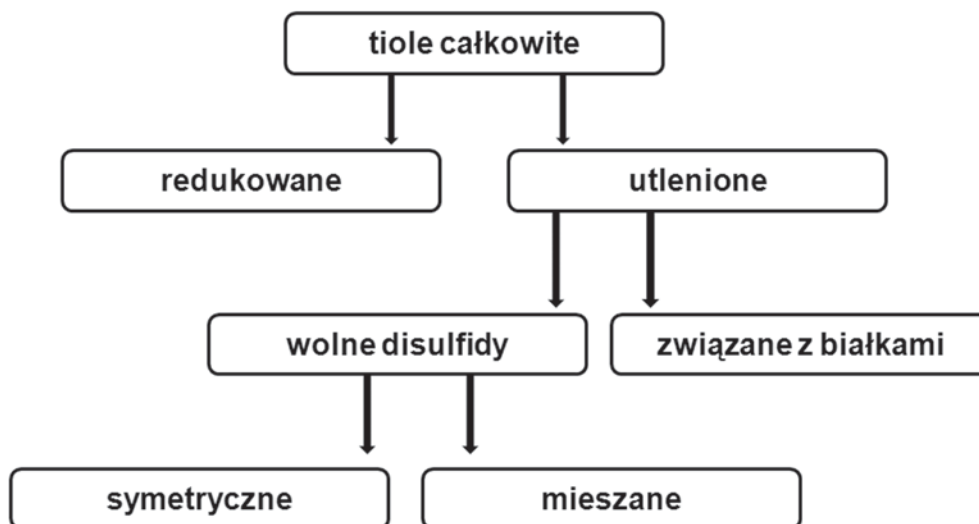
Związki tiolowe można podzielić na niskocząsteczkowe (NSH) i białkowe (PSH). Są one składnikami tiolowo-disulfidowego buforu redoks. Różne formy tioli przedstawiono na rycinie 1. Wewnątrzkomórkowy stan redoks związków zawierających w swojej cząsteczce grupę tiolową, odgrywa bardzo ważną rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury i funkcji białek, kontroli aktywności czynników transkrypcyjnych, regulowaniu aktywności enzymów, obronie przed stresem oksydacyjnym i ksenobiotykami.

Grupy tiolowe białek, pochodzące od cysteiny, mogą występować jako wolne tiole, disulfidy i mieszane disulfidy w połączeniu z niskocząsteczkowymi tiolami: glutationem, cysteiną, homocysteiną i γ -glutamylcysteiną [8, 9].

S-tiolacja białkowych tioli poprzez reakcję wymiany tiol/disulfid (SH/SS) przebiega w następujący sposób: $\text{PSH} + \text{GSSG} \rightarrow \text{PSSG} + \text{GSH}$.

Utlenienie i redukcja tioli oraz białkowych disulfidów jest dynamicznym, odwracalnym procesem zachodzącym w komórce w warunkach fizjologicznych. Utlenienie białkowych tioli do mieszanych disulfidów jest wczesną odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny [23, 25, 73, 78]. Stężenie białkowych grup tiolowych w komórce wynosi 20–40 mM i przewyższa stężenie glutationu (2–10 mM) [9]. W osoczu białkowe tiole są prawie wyłącznie reprezentowane przez albuminę (0,6–0,7 mM) [9].

Reszty cysteiny w białkach mogą ulec odwracalnemu utlenieniu do nietrwałych kwasów sulfenowych (białko-SOH). Kwasy te mają silnie elektrofilowy atom siarki, dzięki czemu mogą wchodzić w reakcję w tiolami, prowadząc do powstania mieszanych disulfidów. Grupy tiolowe cysteiny w białkach mogą także ulec nieodwracalnemu utlenieniu do kwasów sulfinowych (białko-SO₂H) i kwasów

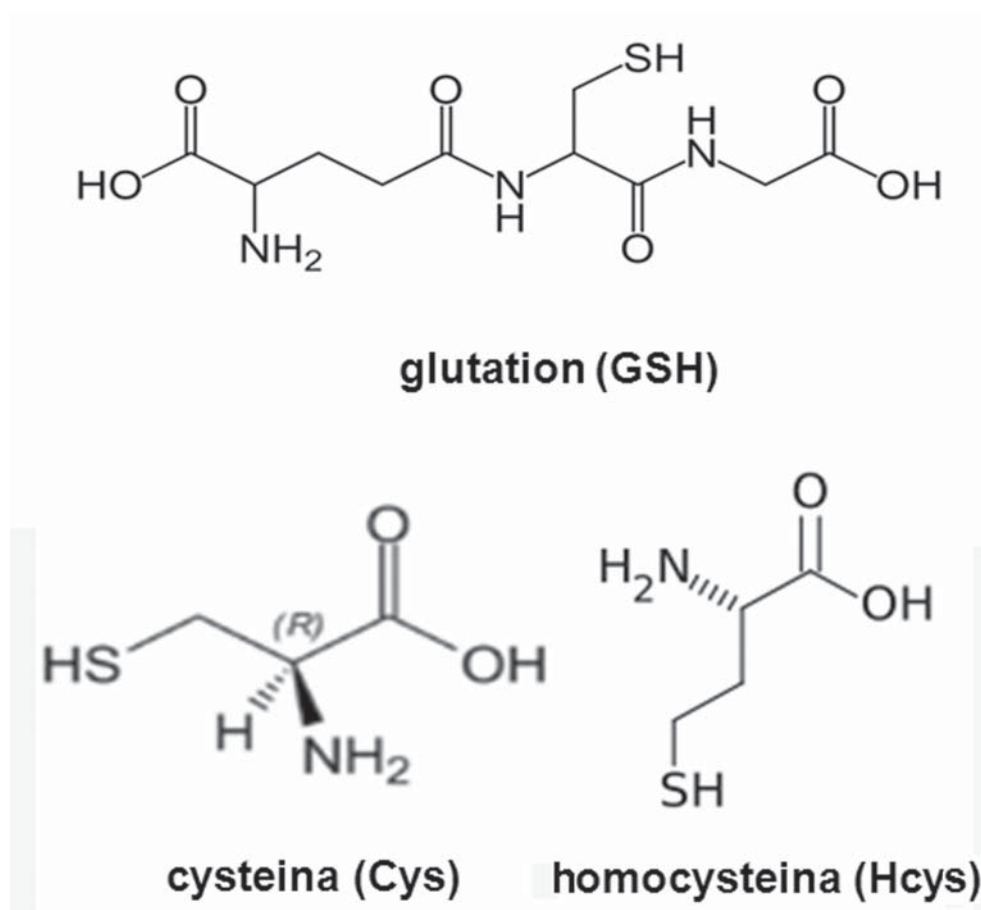


RYCINA 1. Różne formy tioli
FIGURE 1. The different forms of thiols

sulfonowych (białko-SO₃H). Zredukowany stan grup tiolowych występujących w białkach pełni ważną rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury i funkcji białka. Dlatego też nieodwracalne utlenienie oznacza utratę wszystkich biologicznych funkcji zależnych od właściwości grup tiolowych w cząsteczkach białek [84, 85].

CHARAKTERYSTYKA NISKOCZĄSTECZKOWYCH TIOLI

Do najważniejszych niskocząsteczkowych związków mających grupę –SH i występujących w komórce należą: glutation (GSH), homocysteina (Hcys), cysteina (Cys) i cysteinylglicyna (ryc. 2) [9, 84, 85]. Wewnątrzkomórkowy poziom niskocząsteczkowych tioli jest dużo niższy niż wysoce heterogenna pula tioli białkowych. Związki tiolowe odgrywają centralną rolę w metabolizmie i homeostazie komórkowej.



RYCINA 2. Wzory chemiczne wybranych niskocząsteczkowych związków mających grupy tiolowe i występujących w komórce

FIGURE 2. The chemical structure of selected low-molecular-weight thiols, which are present in the cell

W osoczu krwi ludzkiej GSH, Hcys i Cys są metabolicznie spokrewnione. Homocysteina może być katalizowana do cysteiny, a ta z kolei jest prekursorem glutationu, bardzo ważnego z biologicznego widzenia tripeptydu.

GLUTATION

Glutation (GSH) jest wszechobecnym tiolowym tripeptydem występującym w komórkach zwierzęcych w wysokim stężeniu, od 1 do 10 mM, głównie w postaci zredukowanej (GSH); postać utleniona (GSSG) stanowi mniej niż 1% całkowitej puli. Częsteczkę glutationu charakteryzuje nietypowe wiązanie peptydowe (tzw. izopeptydowe), które sprawia, że wewnątrzkomórkowe peptydazy nie mogą hydrolizować glutationu, dzięki czemu może bez przeszkód spełniać w komórkach swoje biologiczne funkcje. W środowisku pozakomórkowym dominuje postać utleniona GSSG. Zredukowany glutation może być przekształcany w formę utlenioną podczas stresu oksydacyjnego. W warunkach łagodnego stresu oksydacyjnego, gdy tempo utlenienia jest niskie, większość powstającego GSSG jest enzymatycznie redukowana do GSH za pośrednictwem reduktazy glutationowej. Z kolei w warunkach silniejszego stresu, gdy tempo tworzenia GSSG przewyższa jego redukcję, dochodzi do kumulowania GSSG wewnątrz komórek. Taki wzrost prowadzi do reakcji S-tiolacji białek poprzez reakcję wymiany tiol-disulfid. Następuje tak zwana glutationylacja białek [3, 84–86].

Do najważniejszych funkcji biologicznych GSH należy zmiatanie reaktywnych form tlenu, detoksykacja ksenobiotyków i kancerogenów, utrzymywanie prawidłowej struktury i funkcji białek. Glutation uczestniczy w syntezie leukotrienów i prostaglandyn, tworzeniu adduktów glutation-NO^{*}. Pełni funkcję magazynu i formy transportowej cysteiny, a także uczestniczy w tak istotnych procesach komórkowych, jak: transkrypcja, apoptoza, biosynteza DNA, transdukcja sygnału i ekspresja genów, proliferacja komórek, regulacja aktywności enzymów, produkcja cytokin i obrona immunologiczna [3, 84–87].

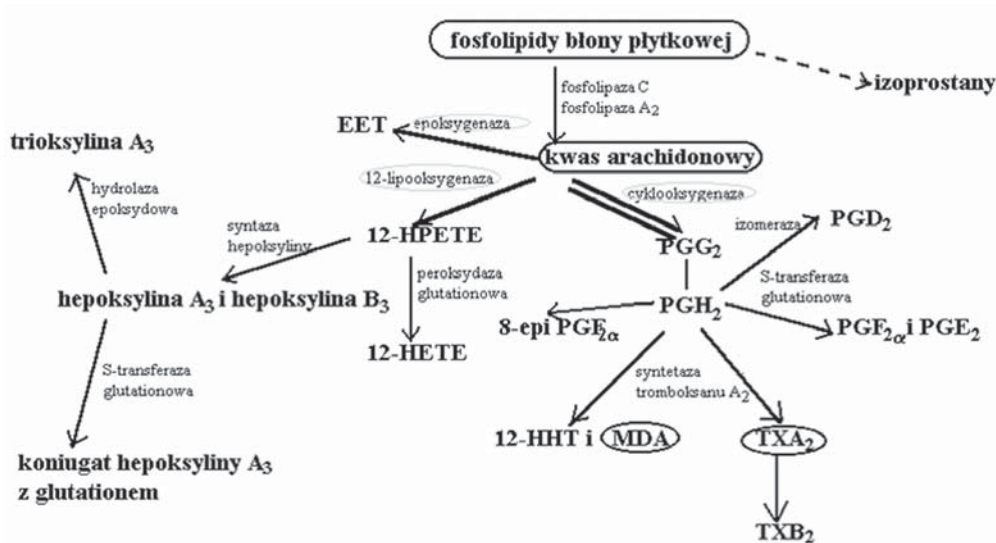
Glutation uważany jest za najważniejszy komórkowy „bufor tiolowy”. Stan redoks komórki zależy od stosunku stężeń postaci zredukowanej glutationu do postaci utlenionej [GSH]/[GSSG]. Stosunek ten wynosi od 30 : 1 do 100 : 1 w komórkach, co sprawia, że środowisko staje się wysoce redukujące. W tych warunkach powstawanie wiązań disulfidowych jest mało prawdopodobne. W warunkach stresu oksydacyjnego proporcja [GSH]/[GSSG] obniża się do zakresu wartości 1–10 [3, 4, 38, 84–87].

W niepobudzonych płytkach krwi proporcja [GSH]/[GSSG], stanowiąca miarę stanu oksydacyjno-redukcyjnego wynosi około 45 [8, 13, 14, 70]. Ponad 90–95% wewnątrzpłytkowego glutationu utrzymywana jest w formie zredukowanej. Płytki zawierają stosunkowo mało GSH, którego zawartość wynosi około 2 mM, czyli 1–15 nmoli GSH/10⁹ płytek [70]. Niewiele jest danych na temat roli wewnątrzkomórkowego GSH w biologicznych funkcjach płytek krwi, takich jak np. agregacja. Wiadomo jednak, że glutation występujący w cytozolu płytek krwi ma wpływ na ich aktywację. Przekształcenie cytoplazmatycznego GSH do GSSG hamuje agregację płytek oraz wzmacnia tworzenie mostków disulfidowych pomiędzy białkami cytoszkieletu płytek [16, 17].

W pobudzonych płytkach krwi glutation uczestniczy również w regulowaniu metabolizmu kwasu arachidonowego (AA), który towarzyszy aktywacji tych komórek. Stymulacja fosfolipazy A₂ (PLA₂) lub fosfolipazy C (PLC) przez układ heterotrimerycznych białek G prowadzi do uwalniania AA z fosfolipidów błony płytkowej. Kwas ten jest następnie przekształcany do dwóch cyklicznych nadtlenków prostaglandyn (PGG₂ i PGH₂), poprzez działanie aktywnej cyklooksygenazy płytek. Cyklooksygenaza wykazuje też aktywność peroksydazową. 12-lipooksygenaza obecna w płytkach katalizuje utlenianie kwasu arachidonowego do kwasu 12-hydroperoksyekoizatetraenowego (12-HPETE). Dodatkowo niestabilny metabolit 12-HPETE jest przekształcany do formy stabilnej, 12-hydroksyeikoizatetraenowego kwasu (12-HETE) przez zależną od glutationu peroksydazę. 12-HETE hamuje agregację płytek. Powstająca w drodze zależnej od cyklooksygenazy – PGG₂ jest przekształcana do PGD₂ (słabego agonisty płytek) i do tromboksanu A₂ (silnego agonisty płytek). Dlatego właśnie glutation, poprzez wpływ na wytwarzanie agonistów płytek krwi, pełni ważną rolę w ich funkcjonowaniu. Dokładny przebieg metabolizmu arachidonianu w płytkach krwi został omówiony przez Olas i Wachowicz [60]. Schemat przemiany arachidonianu i roli glutationu w tym procesie przedstawiono na rycinie 3.

Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* potwierdzają związek pomiędzy poziomem glutationu w płytkach krwi a produkcją reaktywnych form tlenu w tych komórkach, ponieważ butioninosulfoksymina (BSO) – inhibitor syntetazy γ -glutamylcysteinowej obniża poziom glutationu z jednoczesnym obniżeniem RFT w płytkach krwi [59, 83].

Wykazano także, że podawanie egzogenego GSH znacznie podnosi wydajność reakcji syntezy NO* katalizowaną w płytkach przez syntazę tlenu azotu (NOS), co daje korzystne efekty terapeutyczne. Zjawisko to zaobserwowano w grupie chorych na cukrzycę, jednak efekt ten był przejściowy i ustępował po zaprzestaniu podawania GSH [50]. Ponadto, stwierdzono, że egzogeny GSH może modulować aktywność płytek krwi w zależności od stężenia. Niskie stężenia GSH (1 mM) nie wpływają istotnie na poszczególne etapy aktywacji płytek, jak agregacja ADP-zależna, czy sekrecja związków zmagazynowanych w ziarnistościach. Jedynie wyższe stężenia GSH (3 i 10 mM) są w stanie zahamować wspomniane reakcje, gdy jako agonistów użyje się ADP lub PAF. Natomiast nie zaobserwowano zmian dla aktywacji indukowanej kolagenem. Sugeruje się, że GSH nie może wpływać na szlaki regulujące powyższe reakcje bezpośrednio w płytkach, ze względu na słabą przenikliwość przez błony komórkowe [50]. Można przypuszczać, że dochodzi do zmiatania przez GSH w środowisku zewnątrzkomórkowym wolnych rodników, które działają na płytki jako wtórne przekaźniki sygnału [63]. Istotne więc wydaje się współdziałanie antyoksydacyjnych systemów w płytkach krwi, z systemami osoczowymi. Te ostatnie również uczestniczą w rozkładzie donorów NO* i regulowaniu jego stężenia we krwi. Dowodem na to może być ścisła zależność między aktywnością osoczowej peroksydazy glutationowej, a biodostępnością dla płytek krwi NO* i aterogenezą [37].



RYCINA 3. Metabolizm kwasu arachidonowego w płytkach krwi i rola glutationu w tym procesie. Pod wpływem agonisty dochodzi do aktywacji płytek krwi. Fosfolipaza A₂ lub fosfolipaza C wspólnie z lipazą diacyloglicerolu uwalnia kwas arachidonowy z fosfolipidów błony płytkowej, który przy udziale cyklooksygenazy ulega przemianom do cyklicznych nadtlenków prostaglandyn (PGG₂ i PGH₂), a dalej, pod wpływem syntetazy tromboksanu A₂, do tromboksanu A₂ (TXA₂). W drodze nieenzymatycznej z nadtlenków prostaglandyn PGG₂ i PGH₂ tworzy się kwas 12-hydrokso-5, 8, 10-heptadekatrienowy (12-HHT) oraz dialdehyd malonowy (MDA), natomiast przy udziale S-transferazy glutationowej powstają prostaglandyny PGF_{2α} i PGE₂, wykazujące właściwości proagregacyjne. Z udziałem izomerazy PGD₂ z nadtlenków prostaglandyn PGG₂ i PGH₂ powstaje prostaglandyna PGD₂ (hamująca agregację płytek krwi). Metabolizm arachidonianu katalizowany przez 12-lipooksygenazę prowadzi do wytworzenia głównie hydroksokwasów ((kwas 12-hydroperoksoeikozatetraenowy (12-HPETE) i kwas 12-hydrokso-eikozatetraenowy (12-HETE)) oraz hepoksylin (hepoksyliny A₃ i hepoksyliny B₃). Hepoksylina A₃ może ulegać skoniugowaniu z glutationem w formie zredukowanej (GSH) przy udziale S-transferazy glutationowej lub może być przekształcana w obecności hydrolazy epoksydowej do trioksyliny A₃. 12-lipooksygenaza również katalizuje przemianę leukotrienu A₄ do lipoksyn. Epoksygenaza współdziałająca z cytochromem P₄₅₀ przekształca kwas arachidonowy w kwasy epoksoeikozatrienowe (EET): 5, 6 EET; 8,9 EET, 11, 12 EET, a głównie do 14, 15 EET. W krwince płytkowej arachidonian może ulegać nieenzymatycznej przemianie do izoprostanów

FIGURE 3. Metabolism of arachidonic acid in blood platelets and the role of glutathione in this process. Activation of blood platelets is stimulated by an agonist. Phospholipase A₂ or C together with diacylglycerol lipase releases from platelet membrane phospholipids free arachidonic acid, which in the presence of cyclooxygenase is converted to peroxide prostaglandins (PGG₂ and PGH₂); and then to thromboxane A₂ through synthase thromboxane. Nonenzymatically from PGG₂ and PGH₂; 12-heptadekatrienoic acid (12-HHT) and malonyldialdehyde (MDA) are formed; in the presence of glutathione S-transferase proaggregatory prostaglandins (PGF_{2α} and PGE₂) are generated. Isomerase PGD₂ converts PGG₂ and PGH₂ to PGD₂ (inhibitors of platelet aggregation). Metabolism of arachidonic acid in the presence of 12-lipoxygenase results in the formation mainly hydroxyacids (12-hydro-peroxy-eicosatetraenoic acid (12-HPETE) and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE)) and heptoxylins (heptoxilin A₃ and heptoxilin B₃). Heptoxilin A₃ forms conjugates with glutathione (GSH) in the presence of glutathione S-transferase or gives trioxilin A₃ in the presence of epoxyhydrolase. 12-lipoxygenase stimulates conversion of leukotriene A₄ from leukocyte to lipoxins. Epoxygenase with cytochrome P₄₅₀ converts arachidonic acid into epoxyeicosatrienoic acid (EET): 5, 6 EET; 8,9 EET, 11, 12 EET, mainly to 14, 15 EET. In platelets from arachidonic acid nonenzymatically isoprostan can be produced

Warto wspomnieć, że metabolizm glutationu w płytkach krwi może się bezpośrednio przekładać na antyoksydacyjne właściwości tych komórek względem innych tkanek. Przykładem może być ochrona przez płytki krwi z zachowanym cyklem glutationowym śródbłonna poddanego uszkodzeniom oksydacyjnym. Inhibitory cyklu glutationowego zmniejszają ochronne zdolności płytek względem śródbłonna. Prawdopodobnie płytki bogate w układy antyoksydacyjne przejmują na siebie ataki wolnych rodników zmniejszając tym samym ich reakcje z komórkami w ścianie naczynia [77].

Powyższe dane są kolejnymi przedstawiającymi GSH jako dobroczynną cząsteczkę o charakterze antyaterogennego antyutleniacza. Należy jednak pamiętać, iż stwierdza się również proagregacyjne, a więc i prozakrzepowe działanie GSH. Sam GSH nie ma wpływu na aktywację płytek krwi, a raczej modyfikując stan redoks płytek przełącza receptory integrynowe w stan wzmożonej wrażliwości tak, że niższe stężenia fizjologicznych agonistów są wystarczające do aktywowania płytek [15].

CYSTEINA I CYSTEINYLOGLICYNA

Cysteina jest czynnikiem redukującym, a także substratem w biosyntezie białek i glutationu oraz prekursorem reaktywnej metabolicznie siarki sulfonowej. Podwyższony poziom cysteiny w komórkach i w osoczu może prowadzić do niebezpiecznego powstawania mieszanych disulfidów z białkami, a proces ten szczególnie nasila się podczas stresu oksydacyjnego. Cysteina w porównaniu z tiolowym tripeptydem glutationem jest nie tylko mniej skutecznym antyoksydantem, lecz równocześnie o wiele bardziej niebezpiecznym prooksydantem. Rola cysteiny i cysteinoglicyny jako antyoksydacyjnych buforów prawdopodobnie ma niewielkie znaczenie biologiczne. Spowodowane jest to tym, że ich stężenia są dużo niższe niż stężenia GSH (stężenie wewnątrzkomórkowe: 400–800 μM , zewnątrzkomórkowe: 10–40 μM [84]). Wyniki doświadczeń wykonane na płytkach krwi wskazują, że cysteina potęguje agregację płytek krwi wywołaną różnymi fizjologicznymi agonistami (ADP, epinefryną, kolagenem), jednak wymagane stężenia cysteiny są 10-krotnie wyższe niż stężenie GSH [21]. Brak jest natomiast informacji na temat wpływu cysteinoglicyny na właściwości biologiczne płytek krwi.

HOMOCYSTEINA

Homocysteina jest homologiem cysteiny, a zarazem pochodną metioniny, od której różni się brakiem grupy metylowej przy atomie siarki (ryc. 2) [2, 30, 31, 64]. Hcys powstająca we wszystkich komórkach organizmu, uwalniana jest do osocza, gdzie krąży w dwóch formach: utlenionej (98%) i zredukowanej (2%). Około 70% homocysteiny utlenionej jest związana z białkami (albumina, hemoglobina). Pozostała część występuje w połączeniach innych niż z białkami. Najczęściej w postaci disulfidów z niskocząsteczkowymi tiolami, jako homocystyna (Hcys-S-S-Hcys) czy disulfid z

cysteina (Cys-S-S-Hcys) [30, 31, 64]. Najbardziej reaktywną formą Hcys jest jej tiol-akton (HTL), który wiąże się spontanicznie z białkami (w reakcji homocysteinylacji), upośledzając funkcje tych białek [26–29, 32, 64]. Jednostkę chorobową charakteryzującą się podwyższonym stężeniem Hcys nazwano hiperhomosteinią; HHcys). Badania populacyjne wykazały, że podwyższone stężenie Hcys sprzyja występowaniu chorób układu krążenia, w których istotną rolę spełniają płytki krwi. Z dostępnych danych wynika, że istnieje zależność między stężeniem Hcys we krwi a nasiloną tendencją płytek krwi do agregowania [11, 52, 67, 81]. Tendencja ta może być unormowana wraz z przywróceniem prawidłowego stężenia Hcys [54]. HHcys i hiperagregacja występują m.in. u pacjentów z niedokrwieniem kończyn [55], chorobie zatorowej tętnic obwodowych [68], w cukrzycy [75], a także w zwierzęcych modelach HHcys [11]. Jednocześnie Hcys sprawia, że płytki krwi stają się niewrażliwe na działanie czynników antyagregacyjnych, np. S-nitrozoglutationu (GSNO) [68]. Aktywacja płytek krwi przez Hcys jest jednak wciąż kwestią sporną. Niektórzy badacze nie obserwują zmian prozakrzepowych w HHcys [7], a niekiedy wręcz opisują antyagregacyjne działanie Hcys [19]. W pracach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* proagregacyjne działanie Hcys, zwłaszcza w wyższych stężeniach (100 μ M) jest bezsprzeczne [36, 58, 88]. Ponadto przeprowadzone doświadczenia wykazały, że nie tylko Hcys, ale także tiolakton homocysteiny ma wpływ na właściwości biologiczne płytek krwi [51], przypuszczalnie odbywa się to przez aktywację integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [53]. Prontera i współpracownicy [65] sugerują natomiast, że Hcys moduluje system receptorów CD40. Zaobserwowano, że Hcys i jej tiolakton stymulują wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego w płytkach krwi w stanie spoczynkowym, jak i w płytkach aktywowanych trombina. Zarówno Hcys, jak i HTL modyfikują białka płytek krwi; zmieniają poziom grup karbonylowych, 3-nitrotyrozyny i grup tiolowych [58]. Badania te potwierdzają związek pomiędzy poziomem grup tiolowych w białkach płytkowych, a procesem agregacji płytek krwi. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku zastosowania innych niskocząsteczkowych tioli – GSH, Cys i cysteinylglicyny [16].

Białkami zaangażowanymi w przekazywanie sygnału indukowanego w płytkach krwi przez Hcys są kinazy Src, p72syk, p38MAPK oraz fosfolipaza PLC2- γ , a także fosfolipaza A₂, regulująca syntezę kwasu arachidonowego, metabolizowanego następnie do tromboksanu A₂. Zmiany stanu aktywacji wspomnianych kinaz i fosfataz są poprzedzane wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i syntezą reaktywnych form tlenu [42, 43, 47, 74].

Warto zaznaczyć, że Hcys moduluje też szlaki syntezy tlenu azotu w płytkach krwi. Początkowo sądzono, że czynnikiem docelowym jest dla Hcys syntaza tlenu azotu. Jednak w warunkach HHcys aktywność NOS pozostaje niezmienną. Wykazano natomiast, że Hcys obniża stężenie substratu dla NOS, jakim jest arginina, hamując jej transport do wnętrza płytek [44]. Wyraźne zależności między stężeniem Hcys we krwi, a syntezą NO[•] w płytkach obserwowane są nie tylko u osób chorych, np. z cukrzycą, ale również u zdrowych osobników [56]. Dokładne mechanizmy działania homocysteiny i jej tiolaktonu na wybrane elementy układu hemostazy, w tym na płytki krwi zostały opisane przez Karolczak i Olas [35].

Izomerazy tiolowe

Istotną rolę w biologicznej aktywności białek jest zachowanie ich odpowiedniej struktury przestrzennej. Głównym mechanizmem za to odpowiedzialnym jest generowanie mostków disiarczkowych między grupami tiolowymi reszt cysteiny w białkach. Reakcja ta zachodzi głównie w świetle retikulum endoplazmatycznego i jest katalizowana przez białkową izomerazę disulfidową – PDI (ang. *Protein Disulfide Isomerase*). Odbywa się to poprzez wymianę wolnych tioli na disiarczki, a w cyklu tym kluczową rolę odgrywają 4 cysteiny – po 2 w każdym z dwóch centrów aktywnych PDI [20].

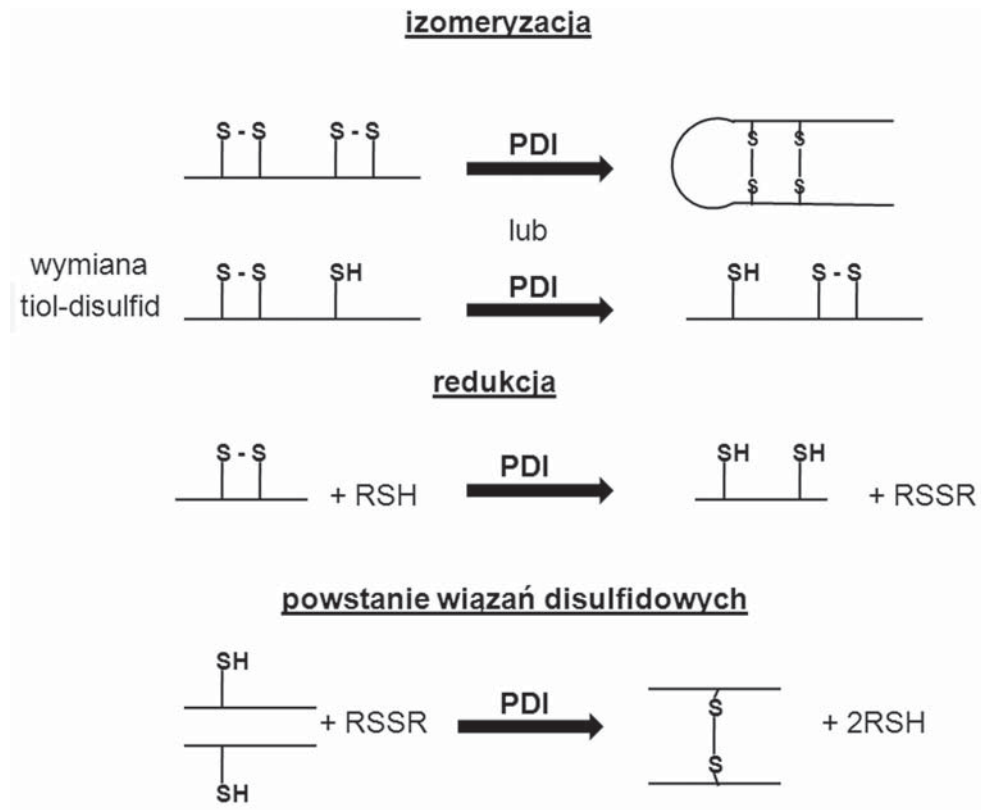
Na zewnętrznej powierzchni błony płytek krwi występuje izomeraza białkowych disulfidów (PDI). Ludzka izomeraza białkowych disulfidów jest homodimerem, zbudowanym z podjednostek o masie 57 kDa, zawierających 491 aminokwasów. Ma dwa regiony o wewnętrznej homologii, z których każdy zawiera sekwencję Cys-Gly-His-Cys [12–14, 17]. PDI ma dwa miejsca aktywne zawierające sąsiadujące tiole, które są w równowadze z wiązaniami disulfidowymi [12, 48, 49]. Enzym ten bierze udział zarówno w procesie agregacji, jak i sekrecji, a także uczestniczy w aktywacji płytkowego receptora dla fibrynogenu – integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ [48, 49]. Stwierdzono także udział PDI w adhezji płytek, w której pośredniczą integryny $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ oraz integryna $\alpha_2\beta_1$ [13, 14, 41]. Potencjalnym celem PDI na powierzchni płytek jest też receptor P2Y₁₂ dla ADP.

PDI jest enzymem, który może katalizować trzy reakcje: izomeryzację wiązań disulfidowych (włączając reakcję wymiany tiol-disulfid), redukcję i utlenienie (ryc. 4) [12–14, 17, 48, 49]. Uważa się, że powierzchniowa płytkowa PDI katalizuje głównie redukcję i izomeryzację wiązań disulfidowych [15]. Wykazano, że aktywacja płytek powoduje redukcję wiązań disulfidowych w miejscach aktywnych PDI, w wyniku czego dochodzi do ekspozycji grup tiolowych [6]. Wśród przynajmniej 11 białek płytkowych ujawniających swe grupy tiolowe podczas agregacji jest również PDI [15].

Przesunięcie w kierunku formy tiolowej zwiększa aktywność PDI. Hamowanie aktywności PDI przez jej inhibitory, redukuje agregację płytek krwi indukowaną różnymi agonistami i sekrecję związków zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych [18, 41], a zatem można stwierdzić, że PDI jest kluczowym białkowym regulatorem aktywacji płytek krwi, na którą składają się reakcje wiązania fibrynogenu, adhezji i sekrecji. Kontrowersje budzi ilość aktywnych enzymatycznie puli PDI i ich komórkowej lokalizacji. Niektórzy badacze nie są w stanie ujawnić cytoplazmatycznej puli PDI, a inni odkrywają ją również na terenie cytozolu, nie tylko we frakcji błonowej [15].

Wykazano także, że PDI reguluje transport tlenu azotu uzyskiwanego przez płytki krwi z donorów NO[•], np. z S-nitrozocysteiny. Uczestnicząc w uwalnianiu NO[•] z cząsteczek donorów PDI reguluje tym samym wewnątrzpłytkowe szlaki regulowane przez NO[•] [5, 72]. Podczas metabolizowania donorów NO[•] zmianie redoks ulegają również tiole PDI.

Innym białkiem o aktywności izomerazy tiolowej jest białko ERP5 (ang. *Endoplasmic Reticulum Protein 5*), które w płytkach krwi lokalizuje się głównie



RYCINA 4. Reakcje katalizowane przez PDI [17, zmodyfikowano]
 FIGURE 4. The reactions catalyzed by PDI [17, modified]

w obrębie błon wewnątrzkomórkowych, skąd po stymulacji agonistami, jest szybko transportowane i eksponowane na zewnętrznej powierzchni błony. Reakcja ta jest zależna od stężenia agonisty. Izomeraźowa aktywność białka ERP5 ujawnia się jedynie w obecności jonów Ca^{2+} , a inhibitorem enzymu jest EDTA. Na podstawie badań funkcjonalnych po zahamowaniu aktywności enzymatycznej białka ERP5 można wnioskować, iż jest ono zaangażowane w regulację agregacji, sekrecji i wiązanie fibrynogenu przez receptory obecne na powierzchni płytki krwi. Przeciwciała anti-ERP5 hamują lub całkowicie blokują agregację wywołowaną kolagenem i konwulsyną. Jednak efekt ten można znieść stosując wysokie stężenia agonistów. Te same przeciwciała blokujące ERP5 zmniejszają wiązanie fibrynogenu przez specyficzne receptory płytkowe. Reakcja ta jest zdecydowanie silniejsza dla płytek stymulowanych konwulsyną niż kolagenem. Obie reakcje markerowe aktywacji płytek krwi (tzn. agregacja i wiązanie fibrynogenu do integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$) są również skutecznie hamowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko PDI. Zastosowanie jednocześnie obu przeciwciał (anty-ERP5 i anty-PDI) daje efekty addytywne. Inhibicja aktywności izomeraźowej ERP5 zmniejsza również ekspozycję selektyny P, markera reakcji sekrecji związków zmagazynowanych w ziarnistościach α [33].

Należy dodać, że w ostatnim okresie wykazano obecność pięciu nowych izomeraz tiolowych: ERp57, ERp72, ERp44, ERp29 i TMX-3, których rola w aktywacji płytek krwi nie jest dokładnie poznana [24].

Udział tioli w funkcjonowaniu integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP IIb-IIIa)

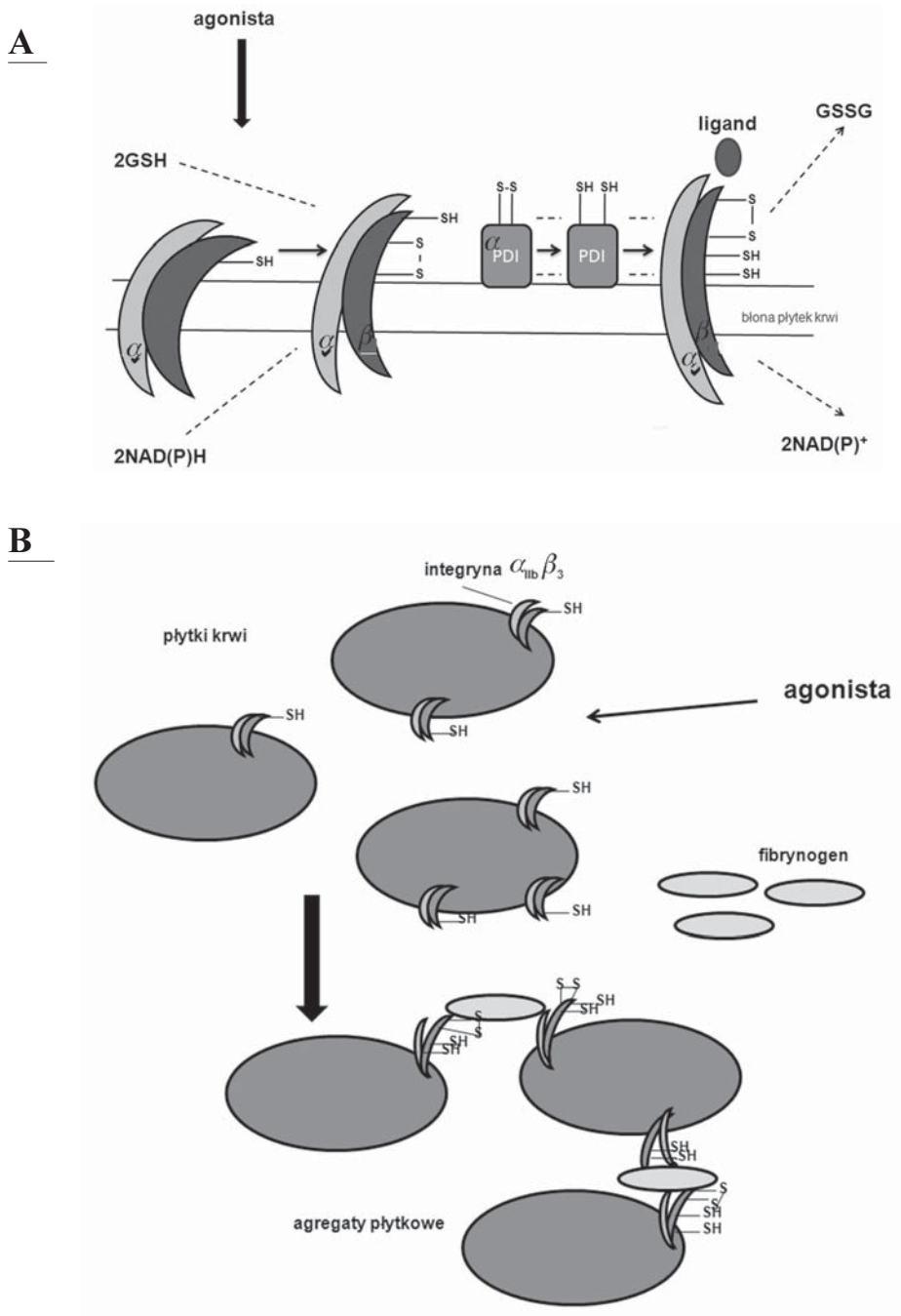
Podstawową funkcją integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ jest udział w procesie agregacji płytek krwi. Płytką krwi zawiera 40 000–80 000 cząsteczek tego heterodimeru, z czego 80% jest związane z błoną płytkową. Mechanizm jej działania polega na wiązaniu rozpuszczalnych białek adhezyjnych zawierających sekwencję RGD (Arg-Gly-Asp): fibrynogenu, fibronektyny, witronektyny i czynnika von Willebranda. Receptor $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ należący do rodziny receptorów integrynowych, składa się z dwóch niekowalencyjnie połączonych transmembranowych białek α i β . Podjednostka α_{IIb} (GP IIb) ma 18 reszt cysteinowych, natomiast β_3 (GP IIIa) zawiera ich 56 [18, 34]. Większość reszt cysteinowych w integrynie $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ występuje w postaci form disulfidowych, ale są też wolne grupy tiolowe [17]. Zewnątrzkomórkowe grupy tiolowe uczestniczą w zmianach konformacji wywołanych oddziaływaniem płytkowej integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ z jej ligandami. Płytkowa integryna $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ może występować w trzech różnych stanach aktywacji. Receptor w stanie nieaktywnym ma na powierzchni wolne grupy tiolowe. Pobudzenie przez agonistę prowadzi do serii cytoplazmatycznych zdarzeń, czego rezultatem jest sygnał z wnętrza płytki i oddziaływanie ligandu (np. fibrynogenu) z receptorem. Dalsze sygnały z wnętrza płytki prowadzą do uzyskania przez integrynę $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ stanu wysokiego powinowactwa. Udział grup tiolowych w funkcjonowaniu integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ i tworzeniu agregatów płytkowych przedstawiono na rycinie 5A i B.

Bez możliwości rozszczepienia mostków disiarczkowych integryna $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ nie jest w stanie spełnić swej podstawowej funkcji, jaką jest wiązanie fibrynogenu umożliwiające agregację tych komórek. Traktowanie $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ czynnikami redukującymi, np. ditiotreiolem (DTT) przekształca integrynę do jej formy aktywnej, ale nie dochodzi do aktywacji, gdy integryna jest inkubowana ze związkami reagującymi z tiolami. A zatem nie jedynie proste zerwanie mostków -S-S- jest ważne dla aktywacji integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, ale możliwość „wymiany” tiol-disulfid [15].

Poza czynnikami chemicznymi, takimi jak wspomniany DTT, aktywacja integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zachodzi po zadziałaniu czynników fizycznych. Powszechnie stosowane do sterylizacji koncentratów płytkowych promieniowanie UV-C aktywuje płytki krwi poprzez fotolityczne zrywanie wiązań disiarczkowych w płytkowych białkach powierzchniowych, w tym w receptorze $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [82].

Istnieje zależność między aktywnym stanem integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, a enzymem PDI. Zablockowanie PDI przeciwciałami hamuje aktywację $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ [15].

Płytkowa integryna $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ma w obrębie podjednostki β_3 motyw CXXC, wspólny dla enzymów zaangażowanych w izomeryzację reszt tiolowych cystein w białkach. Znalazienie tej sekwencji doprowadziło do odkrycia w obrębie integryny $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ aktywności izomerazy tiolowej. Aktywność ta jest wrażliwa na jony Ca^{2+} , stąd obecność chelatora w postaci EDTA sprzyja wzmoczeniu aktywności integrynowej



RYCINA 5 A i B. Udział grup tiolowych w funkcjonowaniu płytkowej integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ (A) [17, zmodyfikowano] i w tworzeniu agregatów płytkowych (B)
 FIGURE 5 A and B. The role of thiol groups in the function of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (A) [17, modified] and blood platelet aggregation (B)

izomerazy. Cecha ta różni izomerazę tiolową integryny od izomerazy tiolowej znalezionej w białku ERP5, która przez EDTA jest hamowana [33, 62].

Udział tioli w funkcjonowaniu receptorów dla ADP

Na powierzchni płytek krwi istnieją dwa receptory dla ADP: P2Y₁ (powiązany z pobudzeniem fosfolipazy C) oraz P2Y₁₂ (związany z hamowaniem cykazy adenylanowej). Odgrywają one ważną rolę w procesie aktywacji płytek i pobudzenie tych receptorów jest bardzo istotne dla indukowanej przez ADP aktywacji płytkowego receptora fibrynogenu – integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ [34]. Płytkowy receptor P2Y₁₂ dla ADP zawiera dwie zewnątrzkomórkowe grupy tiolowe (Cys 17 i Cys 270), które zaangażowane są w aktywację płytek. Różne związki tiolowe reagują z tymi grupami, inaktywując receptor przez zablokowanie wiązania ADP do receptora lub też zaburzają stan redoks komórki. Ponieważ ADP uwalniany z ziarnistości płytkowych odgrywa także rolę w aktywacji płytek pod wpływem innych agonistów (kolagen, trombina), receptor ten stanowi potencjalne miejsce regulacji stanu redoks, niezbędnego dla funkcjonowania płytek [48, 49].

W przeciwieństwie do receptora P2Y₁₂, analogiczne zewnątrzkomórkowe grupy tiolowe cysteiny homologicznego receptora P2Y₁ są połączone wiązaniami disulfidowymi i dlatego nie jest on inaktywowany pod wpływem różnych związków tiolowych. Ponadto w przypadku receptora P2Y₁ istnieje jeszcze wiązanie disulfidowe utworzone pomiędzy Cys 124 a Cys 202 i jest ono ważne dla funkcjonowania tego receptora. Dodatkowo P2Y₁ ma jedno wiązanie -S-S- pomiędzy Cys 42 i Cys 296. Brak tego wiązania disulfidowego prowadzi do zaburzenia przekazywania sygnału przez ten receptor [10].

S-nitrozotiole

S-nitrozotiole (RSNO_s) wykazują biologiczną aktywność w szeregu tak ważnych fizjologicznie procesów, jak: rozkurcz mięśni gładkich, neurotransmisja, immunoregulacja czy proliferacja komórek śródbłonna naczyń [84–86]. Związki te regulują również kilka aspektów fizjologii płytek krwi, między innymi hamowanie różnych etapów aktywacji – adhezji i agregacji [69, 79].

Każda z reaktywnych form azotu powstająca w nadmiarze może stać się odpowiedzialna za toksyczność związaną z NO^{*}, dlatego reakcję RFA z grupami tiolowymi do S-nitrozotiole można uważać za reakcję detoksykacji. RSNO_s powstają głównie w wyniku reakcji tioli z tlenkiem azotu. Tlenek azotu jako rodnik ma niesparowany elektron i nie reaguje bezpośrednio z tiolami. Reakcja następuje dopiero po utracie tego elektronu, tj. po utlenieniu do kationu nitrozoniowego NO⁺, co nadaje mu elektrofilność i reaktywność. S-nitrozotiole powstają w reakcji tego kationu, a także innych reaktywnych form azotu z anionami tiolanowymi (RS⁻) [84–86]: NO⁺ + RS⁻ ⇌ RSNO.

Tworzenie S-nitrozotiole stabilizuje nietrwały ^{*}NO i zachowuje jego biologiczną aktywność w utleniającym środowisku komórkowym [76]. S-nitrozotiole mogą też przedłużyć i częściowo zwiększyć *in vivo* działanie lokalnie powstającego NO^{*} [39].

Powstające endogennie nisko- i wysokocząsteczkowe S-nitrozotiole biorą udział w magazynowaniu i transporcie tlenu azotu, stanowiąc dominującą postać redoksową NO^\bullet . Właściwości biologiczne S-nitrozotiole są podobne do właściwości tlenu azotu. Wykazano, że uwolniony z RSNO_s NO^\bullet dyfunduje przez błonę do wnętrza płytek krwi i aktywuje hemoproteinę – rozpuszczalną cyklazę guanylanową [1, 5, 22, 57, 72]. Zaktywowany enzym uczestniczy następnie w przekształceniu GTP do cyklicznego 3'5' – monofosforanu guanozyny (cGMP). Wzrost wewnątrz-komórkowego stężenia cGMP obniża poziom jonów Ca^{2+} . Mechanizm ten hamuje agregację płytek i czyni je mniej podatnymi do adhezji do ściany naczynia. Jednak dokładny mechanizm odpowiedzialny za hamujące działanie NO^\bullet na płytki krwi nie jest całkowicie jasny. NO^\bullet jest silnym inhibitorem płytek i hamowanie ich funkcji prawdopodobnie odbywa się też poprzez oddziaływanie z grupami tiolowymi w miejscach aktywnych PDI. Stwierdzono, że tworzenie S-nitrozotiole w miejscu aktywnym PDI może hamować jej funkcjonowanie. Z kolei powstawanie S-nitrozotiole w integrynie $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ może zmieniać reakcje wymiany tiol/disulfid zachodzące w tym receptorze. Wykazano, że w płytkach krwi, S-nitrozotiole mogą też powstawać w reakcji tioli z nadtlenoazotynem (ONOO^-), który utlenia grupy tiolowe białek i niskocząsteczkowych tioli, powoduje nitrowanie reszt tyrozynowych oraz tworzenie grup karbonylowych w białkach oraz wpływa na funkcjonowanie tych komórek.

Stwierdzono, że S-nitrozocysteina hamuje poprzez mechanizm niezależny od cGMP agregację płytek krwi indukowaną kolagenem i kwasem arachidonowym. Hamuje również syntezę tromboksanu A_2 w ludzkich płytkach krwi. S-nitrozocysteina wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do płytkowego receptora TXA_2 , co obejmuje jego S-nitrozylację [79]. Z drugiej strony wykazano, że zahamowanie sekrecji związków zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych, indukowane przez S-nitrozocysteinę jest skorelowane ze wzrostem poziomu cGMP w płytkach *in vitro* [46]. W warunkach *in vivo* zaobserwowano, że S-nitrozocysteina jest silnym czynnikiem rozkurczającym naczynia krwionośne.

Głównym rezerwuarem NO^\bullet w komórkach (z wyjątkiem osocza i erytrocytów) jest S-nitrozoglutation (GSNO). Reakcja powstawania GSNO jest termodynamicznie i kinetycznie uprzywilejowana ze względu na wysokie stężenie glutationu w komórkach [84–86]. W płytkach krwi reakcje glutationu z NO^\bullet prowadzą do utworzenia trwałego GSNO. GSNO jest silnym inhibitorem adhezji płytek do włókien kolagenu i komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Działanie to jest podobne do działania egzogenego i endogenego NO^\bullet . S-nitrozoglutation jest także silnym inhibitorem agregacji indukowanej kolagenem w warunkach *in vitro*. Ponadto prostacykliny zwiększają antyagregacyjną aktywność GSNO [66]. Inkubacja GSNO z przemytymi płytkami prowadzi do zależnego od stężenia wzrostu stężenia cyklicznego GMP i AMP. Zauważono również korelację pomiędzy zahamowaniem agregacji a wzrostem cGMP powodowanym przez GSNO, co sugeruje, że jego biologiczne działanie na płytce uzależnione jest od stymulacji cyklazy guanylanowej [66].

Wykazano także, że S-nitrozohomocysteina wykazuje działanie antypłytkowe, aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek mięśni gładkich naczyń, zapobiega adhezji leukocytów i chroni przed apoptozą komórki śródbłonna. Tak więc

przekształcenie Hcys do S-nitrozohomocysteiny ma działanie korzystne i chroni przed aterosogennością homocysteiny. S-nitrozylacja homocysteiny zapobiega powstawaniu wiązań disulfidowych między tym aminokwasem a białkami, lub innymi tiolami, a także przed cyklizacją homocysteiny do jej tiolaktonu [30, 80].

PERSPEKTYWY

W niniejszym artykule przeglądowym starano się przybliżyć obecny stan wiedzy o roli związków tiolowych w płytkach krwi, głównie glutationu, homocysteiny i jej tiolaktonu w funkcjonowaniu płytek krwi, gdyż znaczenie tych niskocząsteczkowych tioli jest najlepiej poznane. Szczególnie interesujące wydają się być badania mechanizmów działania Hcys i jej tiolakton w płytkach krwi. Ciekawe się wydaje zbadanie zależności pomiędzy zmianami funkcji płytek krwi wywołanymi podwyższonym stężeniem homocysteiny czy jej różnymi pochodnymi a chorobami układu krążenia, w których płytki krwi odgrywają istotną rolę. Zastosowanie czułych metod analitycznych pozwoli śledzić losy związków tiolowych w różnych komórkach, co z pewnością przybliży nas do poznania mechanizmów ich działania.

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania składamy prof. dr hab. Barbarze Wachowicz za cenne uwagi w trakcie przygotowywania do druku tego artykułu.

LITERATURA

- [1] ADRIAN K, SKOGBY M, FRIBERG LG, MELLGREN K. The effect of S-nitrosoglutathione on platelet and leukocyte function during experimental extracorporeal circulation. *J Artif Organs* 2002; **27**: 570–575.
- [2] BALD E. Homocysteina, niegdyś egzotyczny metabolit. W: Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii. Włodek L. (red.). Wydawn. Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2003: 73–97.
- [3] BARTOSZ G. Metabolizm glutationu. *Post Biochem* 1993; **39**: 32–37.
- [4] BILSKA A, KRYCZYK A, WŁODEK L. Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Post Hig Med Dośw* 2007; **61**: 438–453.
- [5] BELL SE, SHAH CM, GORDGE MP. Protein disulfide-isomerase mediates delivery of nitric oxide redox derivatives into platelets. *Biochem J* 2007; **403**: 283–288.
- [6] BURGESS JK, HOTCHKISS KA, SUTER C, DUDMAN NP, SZOLLOSI J, CHESTERMAN CN, CHONG BH, HOGG PJ. Physical proximity and functional association of glycoprotein 1b α and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem* 2000; **275**: 9758–9766.
- [7] CETIN O, BEKPINAR S, UNLUCERCI Y, TURKMEN A, BAYRAM C, ULUTIN T. Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to tissue factor and platelet aggregation. *Clin Nephrol* 2006; **65**: 97–102.
- [8] DALLE-DONNE I, GIUSTARINI D, COLOMBO R, MILZANIA, ROSSI R. S-glutathionylation in human platelets by a thiol-disulfide exchange-independent mechanism. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**: 1501–1510.
- [9] DI SIMILICO P, FRANCONI F, FROSALI S, DI GIUSEPPE S. Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids* 2003; **25**: 323–339.

- [10] DING Z, KIM S, DORSAM RT, JIN J, KUNAPULI SP. Inactivation of the human receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys 270. *Blood* 2003; **101**: 3908–3914.
- [11] DURAND P, PROST M, BLACHE D. Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 1996; **121**: 231–243.
- [12] ESSEX DW. Protein disulfide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol* 1999; **104**: 448–454.
- [13] ESSEX DW. Platelet surface glutathione reductase-like activity. *Blood* 2004; **104**: 12383–12385.
- [14] ESSEX DW. The role of thiols and disulfides in platelet function. *Antioxid Redox Signal* 2004; **6**: 736–746.
- [15] ESSEX DW. Redox control of platelet function. *Antioxid Redox Signal* 2008; **8** (w druku).
- [16] ESSEX DW, LI M. Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry* 2003; **42**: 129–136.
- [17] ESSEX DW, LI M. Redox modification of platelet glycoproteins. *Curr Drug Targets* 2006; **10**: 1233–1241.
- [18] ESSEX DW, LI M, MILLER A, FEINMAN RD. Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochemistry* 2002; **40**: 6070–6075.
- [19] FUGLSANG J, STENDER M, ZHOU J, MOLLER J, FALK E, RAVN HB. Platelet activity and in vivo arterial thrombus formation in rats with mild hyperhomocysteinaemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; **13**: 683–689.
- [20] GILBERT HF. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J Biol Chem* 1997; **272**: 29399–29402.
- [21] GIUSTARINI D, CAMPOCCIA G, FANETTI G, ROSSI R, GIANNERINI F, LUSINI L. Minor thiols cysteine and cysteinylglycine regulate the competition between glutathione and protein SH groups in human platelets subjected to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 2000; **380**: 1–10.
- [22] GORDGE MP, HOTHERSALL JS, NORONHA-DUTRA AA. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br J Pharmacol* 1998; **124**: 141–148.
- [23] HANSEN JM, CHOE HS, CARNEY EW, HARRIS C. Differential antioxidant enzyme activities and glutathione content between rat and rabbit conceptuses. *Free Rad Biol Med* 2001; **30**: 1078–1088.
- [24] HOLBROOK LM, SIMMONDS AD, GIBBINS JM. The identification of novel platelet surface thiol isomerase enzymes. *9th UK Platelet Meeting*, Bradford, 2006: 23.
- [25] INAYAMA T, OKA J, KASHIBA M, SAITO M, HIGUCHI M, UMEGAKI K, YAMAMOTO Y, MATSUDA M. Moderate physical exercise induces the oxidation of human blood protein thiols. *Life Sci* 2002; **70**: 2039–2046.
- [26] JAKUBOWSKI H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2000; **277**: 30425–30428.
- [27] JAKUBOWSKI H. Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005; **43**: 1011–1014.
- [28] JAKUBOWSKI H. Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* 2002; **277**: 30425–30428.
- [29] JAKUBOWSKI H. Homocysteine-thiolactone and S-nitroso-homocysteine mediate incorporation of homocysteine into protein in humans. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**: 1462–1466.
- [30] JAKUBOWSKI H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life* 2004; **61**: 470–487.
- [31] JAKUBOWSKI H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; **136**: 1741S–1749S.
- [32] JAKUBOWSKI H, ZHANG L, BARDEGUEZ A, AVIV A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylated in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 2000; **87**: 45–51.
- [33] JORDAN PA, STEVENS JM, HUBBARD GP, BARETT NE, SAGE T, AUTHI KS, GIBBINS JM. A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function. *Blood* 2005; **105**: 1500–1507.
- [34] JORDAN PA, GIBBINS JM. Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal* 2006; **8**: 312–324.
- [35] KAROLCZAK K, OLAS B. Mechanism action of homocysteine and its thiolactone in haemostasis system. *Physiol Res* 2009; **58** (w druku).
- [36] KAROLCZAK K, OLAS B, KOŁODZIEJCZYK J. Modification of blood platelet proteins induced by homocysteine and its thiolactone *in vitro*. *Cell Biol Toxicol* (praca przesłana do Redakcji).

- [37] KENET G, FREEDMAN J, SHENKMAN B, REGINA E, BROK-SIMONI F, HOLZMAN F, VAVVA F, BRAND N, MICHELSON A, TROLLIET M, LOSCALZO J, INBAL A. Plasma glutathione peroxidase deficiency and platelet insensitivity to nitric oxide in children with familial stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 2017–2023.
- [38] KNAPEN MF, ZUSTERZEEL PL, PETERS WH, STEEGERS EA. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; **82**: 171–184.
- [39] KOKKOLA T, SAVINAINEN JR, MONKKONEN KS, RETAMAL MD, LAITINEN JT. S-nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. *BMC Cell Biol* 2005; **6**: 1–17.
- [40] KROTZ F, SOHN HY, POHL U. Reactive oxygen species, players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 1988–1996.
- [41] LAHAV J, JURK K, HESS O, BARNES MJ, FARNDAL RW, LUBOSHITZ J, KEHREL BE. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood* 2002; **100**: 2472–2478.
- [42] LEONCINI G, BRUZZESE D, SIGNORELLO MG. A role for PLC γ 2 in platelet activation by homocysteine. *J Cell Biochem* 2007; **100**: 1255–1265.
- [43] LEONCINI G, BRUZZESE D, SIGNORELLO MG. Activation of p38MAPKinase/cPLA₂ pathway in homocysteine treated platelets. *J Thromb Haemos* 2006; **4**: 209–216.
- [44] LEONCINI G, PASCALE R, SIGNORELLO MG. Effects of homocysteine on l-arginine transport and nitric oxide formation in human platelets. *Eur J Clin Invest* 2003; **33**: 713–719.
- [45] LEVY-TOLEDANO S. Platelet signal transduction pathways: Could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis* 1999; **29**: 4–15.
- [46] LIEBERMAN EH, O'NEILL S, MENDELSONHN M. S-nitroso-cysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet cGMP levels. *Circ Res* 1991; **68**: 1722–1728.
- [47] LUO F, LIU X, WANG S, CHEN H. Effect of homocysteine on platelet activation induced by collagen. *Nutrition* 2006; **22**: 69–75.
- [48] MANICKAM N, SUN X, LI M, GAZITT Y, ESSEX DW. Protein disulphide isomerase in platelet function. *Br J Haematol* 2008; **140**: 223–229.
- [49] MANICKAM N, SUN X, HAKALA KW, WEINTRAUB ST, ESSEX DW. Thiols in the alphaIIb beta3 integrin are necessary for platelet aggregation. *Br J Haematol* 2008; **3** (w druku).
- [50] MARTINA V, BRUNO GA, ZUMPANO E, ORIGLIA C, QUARANTA L, PESCARMONA GP. Administration of glutathione in patients with type 2 diabetes mellitus increases the platelet constitutive nitric oxide synthase activity and reduces PAI-1. *J Endocrinol Invest* 2001; **24**: 37–41.
- [51] MC CULLY KS, CARVALHO AC. Homocysteine thiolactone, N-homocysteine thiolactonyl retinamide, and platelet aggregation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1987; **56**: 349–360.
- [52] MC DONALD L, BRAY C, FIELD C, LOVE F, DAVIES B. Homocystinuria, thrombosis and the blood platelets. *Lancet* 1964; **1**: 745–746.
- [53] MC GARRIGLE SA, WALSH GM, O'NEILL S, MORAN N, COLLINS PB. Homocysteine and its thiolactone derivative promote activation of the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *8th UK Platelet Meeting, Reading*, 2006: 49.
- [54] MEZZANO D, KOSIEL K, MARTINEZ C, CUEVAS A, PANES O, ARANDA E, STROBEL P, PEREZ DD, PEREIRA J, ROZOWSKI J, LEIGHTON F. Cardiovascular risk factors in vegetarians. Normalization of hyperhomocysteinemia with vitamin B(12) and reduction of platelet aggregation with n-3 fatty acids. *Thromb Res* 2000; **100**: 153–160.
- [55] MOHAN IV, JAGROOP IA, MIKHAILIDIS DP, STANSBY GP. Homocysteine activates platelets *in vitro*. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008; **14**: 8–18.
- [56] MUTUS B, RABINI RA, STAFFOLANI R, RICCIOTTI R, FUMELLI P, MORETTI N, MARTARELLI D, MAZZANTI L. Homocysteine-induced inhibition of nitric oxide production in platelets: A study on healthy and diabetic subjects. *Diabetologia* 2001; **44**: 979–982.
- [57] NASEEM KM, CHRICO S, MOHAMMADI B, BRUCKDORFER KR. The synergism of hydrogen peroxide with plasma S-nitrosothiols in the inhibition of platelet activation. *Biochem J* 1996; **318**: 759–766.
- [58] OLAS B, KEDZIERSKAM, WACHOWICZ B. Comparative studies on homocysteine and its metabolite - homocysteine thiolactone action in blood platelets *in vitro*. *Platelets* 2008; **19**: 520–527.
- [59] OLAS B, WACHOWICZ B. Modulation of cisplatin toxicity in blood platelets by glutathione depletion. *Anti-Cancer Drugs* 1998; **9**: 473–478.

- [60] OLAS B, WACHOWICZ B. Struktura i funkcje płytkowych receptorów dla prostanoidów. *Acta Haematologica Polonica* 1999; **30**: 361–369.
- [61] OLAS B, WACHOWICZ B. Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets* 2007; **23**: 1–11.
- [62] O'NEILL S, ROBINSON A, DEERING A, RYAN M, FITZGERALD DJ, MORAN N. The platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36984–36990.
- [63] PACCHIARINI L, TUA A, GRIGNANI G. *In vitro* effect of reduced glutathione on platelet function. *Haematologica* 1996; **81**: 497–502.
- [64] PERLA-KAJAN J, TWARDOWSKI T, JAKUBOWSKI H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007; **32**: 561–572.
- [65] PRONTERA C, MARTELLI N, EVANGELISTA V, D'URBANO E, MANARINI S, RECCHIUTI A, DRAGANIA, PASSERI C, DAVI G, ROMANO M. Homocysteine modulates the CD40/CD40L system. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 2182–2190.
- [66] RADOMSKI MW, REES DD, DUTRA A, MONCADA S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1992; **107**: 745–749.
- [67] RAJKUMAR V, RAGATZKI P, SIMA A, LEVY J. Enhanced platelet aggregation, high homocysteine level, and microvascular disease in diabetic muscle infarctions: Implications for therapy. *Endocrine* 1999; **11**: 57–60.
- [68] RIBA R, NICOLAOU A, TROXLER M, HOMER-VANIASINKAM S, NASEEM KM: Altered platelet reactivity in peripheral vascular disease complicated with elevated plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 2004; **175**: 69–75.
- [69] ROOT P, SLISKOVIĆ I, MUTUS B. Platelet cell-surface protein disulfide-isomerase mediated S-nitroso-glutathione consumption. *Biochem J* 2004; **382**: 575–580.
- [70] ROSSI R, GIUSTARINI D, DALLE-DONNE I, MILZANI A. Protein S-glutathionylation and platelet anti-aggregating activity of disulfiram. *Biochem Pharmacol* 2006; **72**: 608–615.
- [71] RYNINGEN A, HOLMSEN H. W: Platelet Physiology and Pharmacology. Gundu H, Rao R (eds.) Kluwer Academic Publishers, Norwell 1999: 1–22.
- [72] SHAH CM, BELL SE, LOCKE IC, CHOWDREY HS, GORDGE MP. Interactions between cell surface protein disulfide isomerase and S-nitrosoglutathione during nitric oxide delivery. *Nitric Oxide* 2007; **16**: 135–142.
- [73] SCHAFER FQ, BUETTNER GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med* 2001; **30**: 1191–1212.
- [74] SIGNORELLO MG, PASCALE R, LEONCINI G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur J Clin Invest* 2002; **32**: 279–284.
- [75] SIGNORELLO MG, VIVIANI GL, ARMANI U, CERONE R, MINNITI G, PIANA A, LEONCINI G. Homocysteine, reactive oxygen species and nitric oxide in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2007; **120**: 607–613.
- [76] SIMON DI, STAMLER JS, JARAKI O, KEANEY JF, OSBORNE JA, FRANCIS SA, SINGEL DJ, LOSA-CALZO J. Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; **13**: 791–799.
- [77] STRANGE C, GOTTEHRER A, BIRMINGHAM K, HEFFNER JE. Platelets attenuate oxidant-induced permeability in endothelial monolayers: glutathione-dependent mechanisms. *J Appl Physiol* 1996; **81**: 1701–1706.
- [78] THOMAS JA, POLAND B, HONZATKO R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* 1995; **319**: 1–9.
- [79] TSISKAS D, IKIC M, TEWES KS, RAID A, FROLICH JC. Inhibition of platelet aggregation by S-nitrosocysteine via cGMP independent mechanisms: evidence of inhibition of thromboxane A_2 synthesis in human blood platelets. *FEBS Lett* 1999; **442**: 162–166.
- [80] TURSKI AT, BALD E. Mechanizm molekularny biotoksyczności homocysteiny – fakty i hipotezy. *Post Biochem* 2005; **51**: 395–406.
- [81] UNDAS A, STEPIEN E, PLICNER D, ZIELINSKI L, TRACZ W. Elevated total homocysteine is associated with increased platelet activation at the site of microvascular injury. Effects of folic acid administration. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 1070–1072.
- [82] VERHAAR R, DEKKERS D, CUYPER DE I, GINSBERG M, KORTE DE D, VERHOEVEN A. Irradiation disrupts platelet surface disulfide bonds and activates the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood* 2008; **112**: 4935–4939.

- [83] WACHOWICZ B, OLAS B, ZBIKOWSKA HM, BUCZYŃSKI A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; **13**: 175–182.
- [84] WŁODEK L. Cysteina, metabolizm, biologiczna rola i przyczyny toksyczności. W: Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii. Włodek L. (red.), Wydawn. Uniwersytetu Jagiellońskiego 2003: 35–63.
- [85] WŁODEK L. Glutation, antyoksydacyjne i detoksykacyjne właściwości, biologiczna i farmakologiczna regulacja biosyntezy. W: Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii. Włodek L. (red.) Wydawn. Uniwersytetu Jagiellońskiego 2003: 111–151.
- [86] WŁODEK L, ICIEK M. S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny. *Post Biochem* 2003; **42**: 77–83.
- [87] WU G, FANG YZ, YANG S, LUPTON JR, TURNER ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2003; **32**: 489–492.
- [88] ZAICHKO NV, PENTIUK OO, KARBOVSKYI VL. Influence of homocysteine, cysteine, and their derivatives on platelet link of hemostasis system. *Ukr Biokhim Zh* 2007; **79**: 122–132.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 14.01. 2009 r.

Przyjęto: 18.02. 2009 r.

*B. Olas, Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki,
Banacha 12/16, 90-237 Łódź,*

E-mail: olasb@biol.uni.lodz.pl