

MARKERY APOPTOZY W PŁYTKACH KRWI

APOPTOSIS MARKERS IN BLOOD PLATELETS

Barbara WACHOWICZ, Beata OLAS, Joanna RYWANIAK

Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Płytki krwi, bezjądrzaste komórki pochodzące z megakariocytów pełnią podstawową funkcję w hemostazie i powstawaniu zakrzepów. Dowody eksperymentalne opisywane w tej pracy wskazują, że podczas starzenia się płytek (przechowywania), jak i ich aktywacji dochodzi do zmian morfologicznych i biochemicznych oraz pojawienia się niektórych markerów apoptozy, takich jak w komórkach jądrzastych.

Słowa kluczowe: płytki krwi, markery apoptozy, aktywacja.

Summary: Blood platelets, enucleate cells derived from megakaryocytes, play an essential role in haemostasis and thrombosis. They may be involved probably in platelet activation and programmed death. The experimental evidences discussed in this review indicate that during aging and activation platelets express apoptotic markers similar to those found in nucleated cells.

Key words: blood platelets, apoptosis, activation.

Wykaz skrótów: $\Delta\Psi_m$ – potencjał transbłonowy mitochondrium; **Apaf-1** (ang. *apoptosis protease activating factor-1*) – czynnik 1 aktywujący proteazy w procesie apoptozy; **Bcl-2** (ang. *B-cell leukemia/lymphoma-2*) – produkt protoonkogenu Bcl-2; **DcR2** (ang. *decoy receptor*) – receptor pułapka; **MPs** (ang. *microparticles*) – mikroperytyki; **PCs** (ang. *platelet concentrates*) – koncentraty płytkowe; **PS** (ang. *phosphatidylserine*) – fosfatydyloseryna; **PSD** (ang. *platelet storage defect*) – defekt przechowywanych płytek; **PSL** (ang. *platelet storage lesion*) – uszkodzenie przechowywanych płytek; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **RIP** (ang. *receptor interacting protein*) – białko oddziałujące z receptorem; **Smac/DIABLO** (ang. *second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*) – białko proapoptotyczne Smac/DIABLO; wtórny mitochondrialny aktywator kaspazy/białko wiążące bezpośrednio IAP o niskim pI; **SRs** (ang. *scavenger receptors*) – receptory zmiatacze; **TRADD** (ang. *TNF- α R1 associated death domain*) – białko adaptorowe z domeną śmierci wiążące się z receptorem TNF-R1; **TRAIL** (ang. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – ligand z rodziny TNF indukujący apoptozę; **ZVAD-fmk** (ang. *Z-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone*) – inhibitor płytkowej kaspazy 3.

WSTĘP

Płytki, najmniejsze elementy morfotyczne krwi człowieka, pełnią ważną rolę w organizmie. Zaangażowane są nie tylko w proces hemostazy, ale biorą udział w tworzeniu zakrzepów czy w powstawaniu zmian miażdżycowych w ścianach naczyń krwionośnych. Uczestniczą również w procesach zapalnych i procesie metastazy. Płytki krwi ssaków różnią się od komórek pełniących podobne funkcje w hemostazie innych kręgowców nie tylko pochodzeniem, budową morfologiczną, procesami biochemicznymi, ale również stopniem aktywacji warunkującym ich udział w hemostazie. Jedynie u ssaków, w drodze ewolucji, został ukształtowany ekonomiczny system wytwarzający z jednej komórki macierzystej – megakariocytu, od 4 do 8 tysięcy płytek. Z tego względu termin „płytką” odnosi się do pozbawionych jąder komórek krwi ssaków, a nazwę „trombocyt” rezerwuje się dla jądrzastych komórek krwi innych kręgowców, nie pochodzących z fragmentacji megakariocytów, lecz powstających z sukcesywnego podziału tromboplastów w sposób zbliżony do powstawania erytrocytów z erytroblastów. W literaturze jednak te dwa terminy dość często stosowane są wymiennie. Deckhuysen [15] po raz pierwszy w 1901 r. wprowadził nazwę „trombocyt”, uważając, że pomiędzy komórkami krwi różnych kręgowców pełniącymi funkcje hemostatyczne nie ma innych różnic aniżeli morfologiczne. W 1 mikrolitrze ludzkiej krwi znajduje się średnio 300 000 płytek krwi. Czas życia płytek krążących w krwiobiegu i nieuczestniczących w hemostazie wynosi od 9 do 12 dni. Mało poznane są natomiast szlaki śmierci płytek krwi. U ssaków płytki krwi są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi (średnica 2–4 μm), a ich cechą charakterystyczną jest brak jądra komórkowego. Płytką ssaków nie jest więc kompletną komórką, ale cechuje ją bardzo aktywny metabolizm [13]. Niepobudzona płytka ma kształt dyskooidalny. Wyróżnia ją charakterystyczne ułożenie struktur komórkowych. W centrum zlokalizowane są specyficzne ziarnistości α oraz ziarnistości osmofilne o dużej gęstości elektronowej. W tych ziarnistościach są zmagazynowane liczne związki uwalniane w procesie sekrecji. Są to m.in.: białka adhezyjne (fibrynogen, trombospondyna), albumina, osoczowe czynniki krzepnięcia, czynniki wzrostu i cytokiny znajdujące się w ziarnistościach α . Z ziarnistości osmofilnych uwalniane są nukleotydy adeninowe nieuczestniczące w metabolizmie (ADP, ATP), GDP, GTP, jony wapniowe, jony magnezowe, serotonina, histamina i fosfoinozytole. W płytce obecne są również lizosomy, nieliczne mitochondria (1–3), aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna, peroksosomy i ziarna glikogenu. Obwodowo pod błoną komórkową występuje sieć mikrotubul tworzących cytoszkielet płytki. W błonie komórkowej obecne są bardzo liczne receptory związane z enzyma-tycznymi drogami przekazywania sygnałów i aktywacją płytek krwi. Otoczkę zewnętrzną płytki stanowi glikokaliks.

Aby płytki krwi mogły spełniać swoje funkcje hemostatyczne, muszą ulec aktywacji. Fizjologicznymi agonistami płytek krwi są: trombina, kolagen, adrenalina, wazopresyna, czynnik aktywujący płytki (PAF), tromboksan A_2 (TXA_2) czy ADP. Aktywacja płytek to proces kaskadowych, następujących gwałtownie po sobie wielu reakcji enzymatycznych, wywołanych przyłączeniem agonisty do specyficznego receptora i polegających na przekazywaniu sygnału, często przy udziale licznych heterotrimerycznych białek G do

wnętrza płytki. Odpowiedź płytki na działanie czynnika aktywującego prowadzi do adhezji, zmiany kształtu z dyskoidalnego na sferyczny, odłączania mikroplatek, powstania wypustek, sekrecji zmagazynowanych związków i tworzenia agregatów płytkowych. W wyniku tego procesu w płytce dochodzi nie tylko do gwałtownych zmian morfologicznych, ale i biochemicznych. Aktywacja płytek krwi prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , hydrolizy fosfolipidów błony, przemiany fosfatydyloinozytolu, uwolnienia arachidonianu i syntezy eikozanoidów, zmiany zawartości cyklicznych nukleotydów AMP i GMP oraz fosforylacji i defosforylacji białek przy udziale licznych kinaz i fosfataz. Autokrynną stymulacja płytek krwi przy udziale związków uwalnianych z pobudzonych płytek (ADP, serotonina) lub syntetyzowanych przez płytki krwi (TXA_2) jest bardzo ważna w procesie powstawania agregatów płytkowych. Agregacja następuje w wyniku przekazywania sygnału („inside-out”) prowadząc do aktywacji i zmian konformacji receptora integrynowego $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ umożliwiając przyłączenie dimerów fibrynogenu do tych receptorów integrynowych obecnych na powierzchni różnych płytek. Przyłączenie fibrynogenu do płytki wytwarza sygnały („outside-in”) prowadząc do przebudowy cytoszkieletu. Aktywacji płytek towarzyszy również odszczepianie od powierzchni płytek mikrocząstek (mikroplatek) o właściwościach prokoagulacyjnych i ekspresji ujemnie naładowanych fosfolipidów (w tym fosfatydyloseryny) na powierzchni płytek krwi. Podczas aktywacji dochodzi do inicjowania dwóch, wzajemnie ze sobą powiązanych kaskad przekazywania sygnału: kaskady inicjowanej przez hydrolizę fosfolipidów błony i kaskady inicjowanej aktywacją niereceptorowych kinaz tyrozynowych [1,7,28,32,54,69]. Dokładne mechanizmy przekazywania sygnałów w płytkach krwi zostały omówione przez Olas i Wachowicz [45].

Podczas aktywacji płytek dochodzi też do powstawania reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu [16–19,24–26,31,38,39,55,65,66]. RFT w płytkach krwi powstają przede wszystkim w reakcjach enzymatycznych, takich jak: przemiana kwasu arachidonowego, cykl fosfoinozytolu, cykl glutationowy oraz w reakcjach z udziałem oksydaz błonowych, głównie oksydazy NADPH i syntazy NO. Dodatkowe wytwarzanie RFT może być indukowane przez leki, stany zapalne, jony metali ciężkich, wysiłek fizyczny oraz składniki diety. W reakcji tlenu azotu ($\text{NO}\cdot$) powstającego w płytkach krwi [41,72] z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\text{O}_2^{\cdot-}$) uruchamiana jest gwałtowna reakcja tworzenia nadtlenoazotynu (ONOO^-) [9,37,42,43]. Dokładna rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi została opisana przez Olas i Wachowicz [46]. Przy zmniejszeniu skuteczności układów antyoksydacyjnych, nadmiar reaktywnych form tlenu i azotu wywołuje stres oksydacyjny, prowadząc do wielu negatywnych zmian w funkcjonowaniu komórek, w tym w prawidłowym funkcjonowaniu płytek krwi. Wynikiem działania stresu oksydacyjnego może być nawet wejście komórki na drogę apoptozy [4,20,22].

Proces apoptozy w płytkach jest zagadnieniem budzącym wiele kontrowersji. Po raz pierwszy problem śmierci programowanej w nieposiadających jądra płytkach krwi został zasygnalizowany w 1997 r. przez Vanags i wsp. [64]. W ostatniej dekadzie XX wieku wykazano obecność niektórych markerów apoptozy w tych komórkach. Obecny artykuł przedstawia budowę i rolę tych markerów w płytkach krwi.

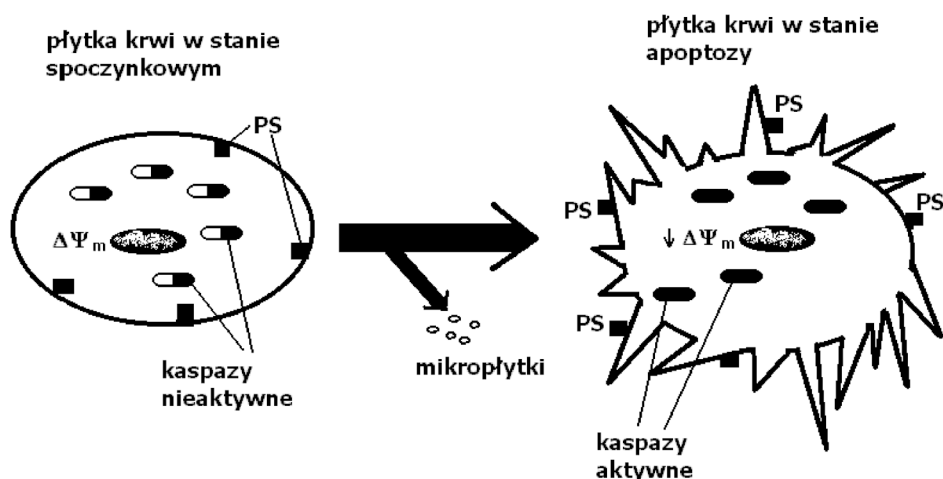
MARKERY APOPTOZY W PŁYTKACH KRWI

Wiele markerów apoptozy występuje w płytkach krwi, ale ich dokładne funkcje są słabo poznane, m.in. ze względu na trudności stosowania metod genetycznych w komórkach pozbawionych jądra, jakimi są płytki krwi. Do tej pory, wykorzystując dostępne techniki badawcze, w płytkach krwi wykazano obecność licznych, typowych biochemicznych znaczników apoptozy, w tym markerów szlaku zewnętrznego i wewnętrznego apoptozy oraz „wykonawców” tego procesu [33]. Stwierdzono obecność „ligandów śmierci”, „receptorów śmierci”, białek adaptorowych, białek rodziny Bcl-2, kaspaz, kalpain i wykazano zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów ($\Delta\Psi_m$), ekspresję fosfatydyloseryny (PS) i tworzenie mikropłytek (MPs) (ryc.1).

Na obecnym etapie badań dotyczących programowanej śmierci płytek krwi, funkcja enzymatycznych efektorowych białek apoptozy jest rozdzielona pomiędzy dwie grupy proteaz cysteinowych: kaspazy i kalpajny. Sugeruje się także możliwość przebiegu zdarzeń apoptotycznych w płytkach bez udziału aktywnych kaspaz [10,68].

Kaspazy

Podczas analizy koncentratów płytek krwi wykryto mRNA dla licznej grupy prokaspaz, włączając prokaspazy 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 [6,12,33-35,49,59,63,67]. Nie stwierdzono obecności prokaspaz 5, 7 i 10 [33]. W modelowej płytkowej apoptozie istotną funkcję pełnią jedynie kaspazy 3 i 9, które ulegają aktywacji i indukują kaskadę apoptotycznych przemian. W przypadku apoptozy *in vitro*, wywołanej inkubacją płytek



RYCINA 1. Wybrane markery apoptozy w płytkach krwi ([33]; zmodyfikowano), objaśnienia w tekście

w temperaturze 37°C zaobserwowano, że aktywność kaspazy 3 zaczynała wzrastać po 3 godzinach, osiągając maksimum w 48 godzinie inkubacji. Towarzyszył temu rozpad głównego substratu kaspazy 3 – gelsoliny, białka zaangażowanego w remodelowanie filamentów aktynowych [6,35]. Atak kaspazy 3 na gelsolinę uwalnia dwa homologiczne fragmenty: C-końcowy (zależny od Ca^{2+}) i N-końcowy (niezależny od Ca^{2+} , ale aktywny w apoptozie) [6]. Gelsolina ulega również rozpadowi w płytkach stymulowanych silnymi agonistami, np. A23187, trombiną z kolagenem [63]. Wzmoczona aktywność kaspazy 3 miała także miejsce po 5 dniach przechowywania płytek w warunkach standardowych, kiedy pojawiała się biologicznie czynna cząsteczka tej kaspazy – p17 [36,59], w wyniku działania na płytki silnego stresu mechanicznego (117–388 dyn/cm²) [33] oraz w obecności silnych agonistów [49,59,63]. Zaobserwowano, że wzrost aktywności kaspazy 9 następował między 6 a 9 godziną przechowywania płytek w temp. 37°C. Aktywne kaspazy (1, 3, 6, 8 i 9) zaobserwowano także *in vivo* u myszy w modelu apoptozy wywołanej infekcją malarii i indukowaną przez iniekcje TNF lub przeciwciał przeciw-płytkowych [34]. Powstawanie aktywnych form kaspaz jest kluczowym zjawiskiem w przebiegu apoptozy komórek jądrzastych prowadzącym do obkurczenia komórki, tworzenia mikroplatek, ekspozycji fosfatydyloseryny i degradacji białek cytoszkieletu.

Głównym inhibitorem płytkowej kaspazy 3 jest inhibitor ZVAD-fmk, który skutecznie hamuje jej funkcje, czego dowodem jest ograniczona proteoliza gelsoliny i zmniejszona liczba tworzących się mikroplatek [12,33,34,36,53,68]. Badania *in vitro* potwierdzają, że preinkubacja płytek ze związkiem ZVAD-fmk znacząco obniża ekspozycję fosfatydyloseryny w płytkach stymulowanych jonoforem wapniowym A23187 i fizjologicznym płytkowym agonistą ADP. Inhibitor ZVAD-fmk obniża również agregację płytek wywołaną ADP, co może wskazywać na udział kaspaz nie tylko w apoptozie, ale także w aktywacji płytek [12]. ZVAD-fmk hamuje również wytwarzanie mikroplatek i udostępnienie prokoagulacyjnych miejsc na powierzchni płytek sprzyjając zakrzepicy. Podobne działanie ma inhibitor DEVD-fmk [34,59]. Wzrost liczby mikroplatek w krwiobiegu jest obserwowany przy licznych zaburzeniach hemostazy (aktywacja krzepnięcia, niedokrwienie miejscowe, stany pooperacyjne, dysfunkcja mięśnia sercowego) [1,73]. Ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni płytki oraz uwalnianie mikroplatek są zjawiskami towarzyszącymi prawidłowemu procesowi hemostazy i tworzeniu zakrzepów, poprzez dostarczanie powierzchni do przyłączenia czynników prokoagulacyjnych. Wydaje się, że inhibicja płytkowych kaspaz może być czynnikiem zapobiegającym powstawaniu zakrzepów i w związku z tym może mieć w przyszłości kluczowe znaczenie w terapii przeciwnzakrzepowej [59].

Uważa się również, że apoptoza w płytkach krwi może zachodzić niezależnie od kaspaz [10,68]. Wolf i wsp. [68] nie stwierdzili aktywności kaspazy 3 po aktywacji płytek trombiną, trombiną i kolagenem oraz jonoforem wapniowym (A23187 lub jonomycyny). Aktywacja kaspazy 3 nie zachodziła także podczas starzenia się płytek *in vitro* w hodowli niezawierającej osocza przy występowaniu typowych morfologicznych i biochemicznych cech apoptozy [10]. W płytkach pozbawionych osocza (prawdopodobnie ważnego źródła czynników przeżycia) zaobserwowano również przyspieszoną apoptozę płytek *in vitro* w temp. 37°C [10]. Dodanie inhibitora kaspazy

3 (ZVAD-fmk) nie wywoływało żadnych zmian w płytkach, dlatego zasugerowano, że kaspazy nie są włączone w programowaną śmierć płytek [10]. Amor i wsp. [2] zaobserwowali po aktywacji płytek trombiną zwiększoną aktywność kaspaz 3 i 9 we frakcji cytoszkieletu bez zmian aktywności we frakcji cytosolowej. Zastosowanie inhibitora polimeryzacji aktyny obniżało aktywację obu kaspaz, co może świadczyć o związku tych enzymów z cytoszkieletem aktynowym. Stymulacja płytek krwi trombiną indukuje nie tylko przemieszczenie do cytoszkieletu form kaspaz aktywnych, ale również prokaspaz 3 i 9.

Fagocytoza płytek w kaspazo-niezależnej apoptozie odbywa się za pośrednictwem tzw. receptorów zmiataczy (SRs, ang. *scavenger receptors*) [10]. Receptory zmiatacze wiążą się z acetylowanymi lub utlenionymi lipoproteinami (ac- lub oxLDL) powstającymi w trakcie apoptozy, a także z innymi białkami o charakterze polianionów na powierzchni komórek apoptotycznych. Wyróżnia się dwie główne klasy tych białek receptorowych: SR-A i SR-B. Receptory klasy A (SR-AI i SR-AII) występują przede wszystkim na makrofagach i charakteryzują się domeną kolagenową zawierającą miejsca wiązania acetylowanych lipoprotein (acLDL). Głównymi przedstawicielami klasy B są SR-BI oraz CD36. W przeciwieństwie do SR-A, receptory zmiatacze klasy B mogą wiązać fosfatydyloserynę [60].

Rola kaspaz w płytkach krwi ciągle budzi wiele wątpliwości. Kaspazy nie uczestniczą w aktywacji płytek krwi [68]. Biorąc pod uwagę fakt, że apoptoza może przebiegać również bez udziału kaspaz, nie wyjaśniono jeszcze znaczenia kaspaz w biologii płytek krwi [10,68]. Eksperymenty *in vitro* wskazują, że wytwarzanie płytek jest skorelowane czasowo z początkiem apoptozy megakariocytów, w której uczestniczą kaspazy [8,11,-62,68]. Tak więc można przypuszczać, iż kaspazy pełnią potencjalną rolę w powstawaniu płytek krwi, a płytkowe kaspazy pochodzą z megakariocytów [68].

Kalpainy

W płytkach krwi kalpainy należące do grupy proteaz cysteinowych zależnych od Ca^{2+} występują w formie nieaktywnej i stanowią ok. 2% białek płytkowych [34]. Aktywację kalpain stwierdzono podczas stymulowania płytek jonoforem wapniowym (jonomycyny lub A23187), trombiną oraz/lub kolagenem [34,64,68]. Kalpainy biorą udział w powstawaniu mikroplatek, ekspozycji PS, zmianie kształtu komórki, degradacji gelsoliny i białkowej kinazy C [34,64,68]. Kalpainy odpowiadają za rozpad białek cytoszkieletu – filaminy, taliny i miozyny, prowadząc do zmian morfologicznych płytek oraz zaburzenia drogi przekazywania sygnału w komórce [67].

Badania *in vitro* po zastosowaniu inhibitora kalpain – kalpeptyny dowiodły, że kalpainy (obok kaspaz) są również enzymami wykonawczymi apoptozy [34]. Kalpeptyna hamuje rozwój zdarzeń apoptotycznych w apoptozie płytek indukowanej jonoforem wapniowym, zapobiega degradacji białek cytoszkieletu, obkurczaniu komórki, tworzeniu mikroplatek oraz aktywacji kaspaz 3 i 9 [64,68]. W płytkach stymulowanych dwoma silnymi agonistami (trombiną i kolagenem), kalpeptyna ogranicza tworzenie mikroplatek i rozpad miozyny, ale powoduje wzrost ekspozycji fosfatydyloseryny [34]. Ponieważ aktywne kalpainy dotychczas zidentyfikowano tylko w modelu apoptozy wywołanej agonistami

(fizjologicznymi: trombina, kolagen i niefizjologicznymi: jonofor wapniowy A23187), można przypuszczać, że kalpains są bardziej związane z aktywacją płytek niż z ich apoptozą, chociaż wywołane przez nie modyfikacje odzwierciedlają typowe zdarzenia apoptotyczne [59].

„Receptory śmierci”, „ligandy śmierci” i białka adaptorowe

Analiza markerów apoptotycznych na poziomie mRNA i białek wykazała, że płytki mają mRNA dla liganda śmierci TRAIL, receptorów śmierci TNF-R1, DcR2, DR3, DR4 i DR5 oraz dla białek adaptorowych TRADD i RIP (tab.1) [34,53]. Badania *in vitro* potwierdziły ekspresję ligandu TRAIL (czynn timer proapoptotyczny z rodziny TNF) w pobudzonych płytkach oraz w czasie różnicowania megakaryocytów [14]. Ekspresję błonowego receptora DcR2 (ang. *decoy receptor* – receptor pułapka) rejestrowano w początkowej fazie przechowywania koncentratów płytkowych [53]. Zaobserwowano także, że spadek potencjału transbłonowego mitochondriów płytki ma miejsce w apoptozie indukowanej agonistami [63] i silnym stresem mechanicznym [33] oraz podczas starzenia się płytek *in vivo* u psów [48]. Spadek $\Delta\Psi_m$ wykryto również między 13 a 14 dniem w przechowywanych koncentratkach płytkowych [33,48,67].

TABELA 1. Receptory śmierci, ligandy śmierci i białka adaptorowe obecne w komórkach jądrazstych i płytkach krwi ([34], zmodyfikowano)

Receptory i ligandy śmierci	Komórki jądrazste	Płytki krwi
Receptory śmierci: TNFR1 (p55) Fas (Apo1) DR3 (Apo3) DR4 (TRAIL-R1) DR5 (Apo2, TRAIL-2) DcR1 DcR2	 + + + + + + +	 + – + + + – +
Ligandy śmierci: TNF FasL Apo3L TRAIL (Apo2L)	 + + + +	 +
Białka adaptorowe: FADD TRADD RIP	 + + +	 + +

Białka rodziny Bcl-2

Kuter i wsp. [29] oraz Leytin i Freedman [34] wykazali w płytkach krwi zarówno ekspresję mRNA dla wielu białek rodziny Bcl-2, jak i ich obecność na poziomie białka (tab. 2). W płytkach krwi odnaleziono szereg białek z rodziny Bcl-2, w tym aktywatory (Bak, Bax, Bad) i inhibitory (Bcl-X_L, Bfl-1, Mcl-1) apoptozy. Nie stwierdzono natomiast obecności proapoptotycznego białka Bik i antyapoptotycznego białka Bcl-W [33,36]. W hodowli starzejących się płytek w temp. 37°C [6] oraz poddanych działaniu wapniowego jonoforu jonomycyny [64] następował wzrost ekspresji białek Bak i Bax [10] oraz obniżenie poziomu białka Bcl-X_L (37°C), co prowadziło do wzrostu wrażliwości płytek na bodźce apoptotyczne [6]. W płytkach stymulowanych różnymi czynnikami, przyczyniającymi się do indukcji apoptozy, pojawiają się zmiany w poziomie ekspresji

TABELA 2. Białka rodziny Bcl-2 w płytkach krwi (zmiany poziomu ekspresji w zależności od warunków) ([34, 48], zmodyfikowano)

Rodzina białek Bcl-2	Płytki niestymulowane	Płytki stymulowane			
		Jonofor wapniowy	Agoniści fizjologiczni	Przechowywane w temp. 37°C	Przechowywane w temp. 22°C
Proapoptotyczne					
Bak	+ r, b	^ b		^ b	= b
Bax	+ r, b	^ b		^ b	
Bad	+ r				
Bik	− r				
Bid	+ b				= b
Bim	+ b				
Antyapoptotyczne					
Bcl-2	+/- r, b	= b		= b	^ b
Bcl-X _L	+ r				^ b
Bcl-w	− r				
Bfl-1	+ r			= b	
Mcl-1	+ r				

+ obecne, - nieobecne, = bez zmian, +/- obecność? r – test na obecność mRNA,
b – test na obecność białka

niektórych białek proapoptotycznych [29,34,36]. Zmiany poziomu ekspresji białek rodziny Bcl-2 przedstawiono w tabeli 2.

Wśród płytkowych białek antyapoptotycznych duże znaczenie ma białko Bcl-X_L, które powstrzymuje proapoptotyczny wpływ Bid i zapobiega uwalnianiu cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy (w płytkach przechowywanych w temp. 37°C). Obniżenie poziomu białka Bcl-X_L nasila wrażliwość płytek na bodźce apoptotyczne [6]. Białko Bcl-X_L ma także wpływ na przeżycie macierzystych komórek płytek krwi. Wysoki poziom ekspresji Bcl-X_L, obserwowany *in vitro* w populacji wczesnych komórek megakariocytów (prekursory CD34(+)) traktowane ekstremalnym forbulą, ulega obniżeniu w miarę starzenia się megakariocytów [56]. Opisowanemu zjawisku towarzyszy wzrost liczby komórek ulegających apoptozie oraz pojawienie się cytoplazmatycznych struktur przypominających przedpłytki. Dlatego przypuszcza się, że białko Bcl-X_L odgrywa rolę w powstawaniu płytek krwi poprzez regulację żywotności i różnicowania megakariocytów [56]. Spośród zidentyfikowanych dotychczas w płytkach krwi pięciu białek proapoptotycznych (Bak, Bax, Bad, Bid i Bim), w stymulowanych płytkach dochodzi do zwiększonej ekspresji tylko dwóch białek – Bak i Bax. Białka Bax i Bak przyczyniają się do wypływu cytochromu c z mitochondriów, na skutek ich przyłączenia do napięciowo-zależnych kanałów anionowych (VDAC) w błonie mitochondrialnej [6,10,64,67].

Ekspozycja fosfatydyloseryny

Błona płytek krwi charakteryzuje się asymetrią fosfolipidów [57]. Fosfatydylocholina i sfingomielina są obecne na powierzchni błony płytkowej, natomiast kwaśne fosfolipidy, m.in. fosfatydyloseryna (PS) są zlokalizowane w części wewnętrznej błony. Podczas aktywacji płytek krwi trombiną czy kolagenem następuje bardzo szybka redystrybucja niektórych fosfolipidów, zwłaszcza przemieszczenie PS, która pojawiając się w monowarstwie zewnętrznej błony, nadaje jej własności prokoagulacyjne i zapewnia prawidłowy przebieg hemostazy. W wielu komórkach obserwowano ekspozycję PS podczas apoptozy, chociaż przemieszczenie fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej nie jest niezbędne dla fenotypu apoptozy. Ekspozycję fosfatydyloseryny na powierzchni komórki zaobserwowano w apoptozie płytek indukowanej wapniowym jonoforem, trombiną, kolagenem, ADP oraz w czasie przechowywania koncentratów płytkowych, jak i zawiesiny starzejących się płytek (także *in vivo*) [33,34,36,40,48,49,-63,64,67,68]. Zaburzenie asymetrii błonowych fosfolipidów i tym samym ekspozycję fosfatydyloseryny powodować mogą w płytkach miejscowe środki znieczulające, które wpływają na depolaryzację błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c oraz na przemianę prokaspaz 3 i 9 do aktywnych form [3]. Obecność fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni dwuwarstwy lipidowej błony płytek krwi jest uznawana za wskaźnik zarówno płytkowej apoptozy, jak i aktywacji.

W komórkach jądrazstych ekspozycja PS jest znacznikiem apoptozy zależnej od kaspaz. Fosfatydyloseryna na powierzchni płytek w stanie apoptozy przyczynia się do usuwania płytek z krążenia za pośrednictwem makrofagów wyposażonych w receptory dla fosfatydyloseryny PS-R [60]. W przemieszczenie fosfatydyloseryny do warstwy zewnętrznej błony zaangażowana jest skramblaza, czyli translokaza fosfatydyloseryny, ATP-aza zależna od Mg^{2+} i Ca^{2+} , aktywowana przez białkową kinazę C (PKC) [60]. Aktywacja skramblazy jest niezbędna do zmiany asymetrii błonowych lipidów podczas apoptozy. Zwiększoną ekspozycję PS na zewnętrznej stronie błony płytek krwi mogą wywoływać zaburzenia metaboliczne powodujące spadek poziomu ATP, aktywacja płytek oraz oksydacyjne uszkodzenia transporterów lipidów błonowych [3,30]. Fosfatydyloseryna na powierzchni błony płytek wykazuje efekt prokoagulacyjny, przyspieszając enzymatyczną degradację białek krzepnięcia [73]. Obecność PS na powierzchni płytek (oraz uwalnianie mikropłytek) wpływa na przyłączanie fibrynogenu do płytek (tworzenie agregatów płytkowych) oraz sprzyja powstawaniu zakrzepów poprzez dostarczanie powierzchni dla czynników koagulacyjnych [49]. Aneksyna należąca do białek antykoagulacyjnych, nieglikozylowanych, wiążących wapń i fosfolipidy może przyłączać się do PS płytek hamując aktywację czynników krzepnięcia [33,49,61,67]. Powierzchniowa PS może być także wskaźnikiem jakości koncentratów płytkowych przeznaczonych do transfuzji. Wzrost ilości PS na powierzchni błony płytek może oznaczać uszkodzenie przechowywanych płytek i wskazywać, które płytki muszą zostać usunięte z krążenia przy udziale fagocytów zawierających receptory dla PS (np. receptor SR-BI i CD36) [30].

Powstawanie mikroplatek

Mikroplateki pojawiają się w wyniku stymulowania platek (*in vitro*) jonoforem wapniowym, trombiną, kolagenem, ADP oraz podczas przechowywania platek (w temp. 22 i 37°C) [34]. Mikroplateki powstają także *in vivo* u myszy w modelu apoptozy wywołanym infekcją malarii i indukowanym przez iniekcje TNF lub przeciwciał antyplatekowych [34]. Formowanie mikroplatek wymaga degradacji cytoszkieletu płytki oraz aktywacji kalpain [33,34,49,67]. Podawanie myszom inhibitora kaspazy (ZVAD) powodowało spadek liczby uwalnianych mikroplatek, dlatego też sugeruje się, że kluczową rolę w fragmentacji platek krwi mogą odgrywać kaspazy [34,59].

Potencjał transbłonowy mitochondriów i cytochrom c

W umierających wskutek apoptozy płytkach krwi otwieranie megakanałów mitochondrialnych przyczynia się m.in. do zmian potencjału transbłonowego ($\Delta\Psi_m$) i uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów białek apoptogennych. Białka uwalniane z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów platek to m.in. zymogeny enzymów efektorowych apoptozy – kaspazy 9 (Apaf-3) czy ich aktywatory (cytochrom c (Apaf-2), Smac/DIABLO) [33,67]. Stosując technikę *immunoblotting* potwierdzono obecność proapoptotycznego, mitochondrialnego białka Smac/DIABLO, które było uwalniane do cytozolu platek w 11 dniu przechowywania koncentratów platekowych w standardowych warunkach (temp. 22°C) [53].

APOPTOZA MEGAKARIOCYTÓW A POCZĄTEK BIOGENEZY PŁYTEK KRWI

Płytki krwi człowieka powstają z megakariocytów. Z jednego megakariocytu powstaje 6 tzw. przedplatek, a z każdej przedpłytki powstaje z kolei około 1200 platek. Czas życia pojedynczej płytki – jeśli nie zostanie zaktywowana – wynosi zaledwie 9–12 dni. Tak krótki czas życia powoduje, iż duża część tych komórek usuwana jest z krążenia bez spełnienia swojej funkcji hemostatycznej i śmierć płytki następuje w wyniku fagocytozy przez makrofagi [11,13].

Jak to się jednak dzieje, że makrofagi „wiedzą”, które płytki należy sfagocytować? Co jest sygnałem dla makrofagów, że po tak krótkim okresie życia płytka musi zostać unicestwiona? Pytania dotyczące śmierci tych bezjądrzastych komórek pozostawały przez wiele lat bez odpowiedzi. Przypuszczano, że usunięcie kwasu sialowego z glikoprotein powierzchniowych błony (odsłonięcie galaktozy) może być sygnałem do wychwytywania platek krwi z krwiobiegu [70].

W płytkach krwi, tak jak w komórkach jądrzastych, obserwuje się aktywację enzymów efektorowych potrzebnych w przebiegu apoptozy, a także stwierdza obecność takich samych, choć nie wszystkich, markerów apoptozy dla komórek jądrzastych. Obecność białek pro- i antyapoptotycznych, a także ekspozycja na powierzchni platek

fosfatydyloseryny czy obserwowany spadek potencjału wewnątrzłonowego mitochondrium [34,59,64,71] wraz z towarzyszącymi zmianami morfologicznymi, takimi jak: obkurczanie krwinek, kondensację ich cytoplazmy, tworzenie pęcherzyków błony komórkowej i wytwarzanie filopodiów, sugeruje możliwość zjawiska apoptozy w płytkach. Do niedawna wszystkie te zmiany opisywano jako aktywację płytek, ale od 1997 roku zaczęto uważać ten proces za apoptozę [9,64]. Jako pierwsi obecność apoptozy w płytkach zasugerowali Vanags i wsp. w 1997 roku [64]. Obecnie wielu badaczy potwierdza występowanie zdarzeń podobnych do apoptozy (ang. *apoptosis-like events*) w płytkach krwi [48,68]. Badanie apoptozy w płytkach jest jednak bardzo trudnym wyzwaniem, gdyż płytki krwi są bardzo wrażliwe na działanie różnych bodźców. Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych płytki bardzo szybko ulegają aktywacji, i zarówno podczas aktywacji, jak i podczas apoptozy dochodzi do podobnych zmian w płytkach [29,34,36,64].

Płytki mogą zawierać w swoim mitochondrialnym genomie informację genetyczną o programowanej śmierci pochodzącą i przekazaną od swoich komórek macierzystych – jądrzastych megakariocytów [58,67].

Istnieje ścisły związek pomiędzy apoptozą megakariocytów a powstawaniem płytek krwi. Apoptoza megakariocyta („koniec”) prowadzi do powstawania płytek, tak więc jest właściwie „początkiem” [8,27,62]. Pod wpływem hematopoetycznych czynników wzrostu, zwłaszcza trombopoetyny, komórki pnia szpiku kostnego przechodzą procesy proliferacji, różnicowania, dojrzewania, stając się dojrzałymi megakariocytami. Zakończenie życia dojrzałego megakariocyta w drodze apoptozy jest zasocjowane w czasie z formowaniem się nowych płytek. Śmierć wczesnych stadiów macierzystych komórek płytek krwi obserwuje się jedynie w stanach patologicznych, np. w czasie terapii nowotworowej lub infekcji wirusem HIV [35].

W początkowym etapie biogenezy płytek z megakariocytów powstają ich prekursorowe odpowiedniki – przedpłytki. Tworzenie tych struktur jest połączone z radykalnymi zmianami w cytoszkielecie megakariocyta, obejmującymi aktywację mikrotubul, polimeryzację aktyny oraz fosforylację miozyny [8,62]. Według teorii tworzenia przedpłytek opisanej przez Italiano i wsp. [23], prekursorzy płytek wyłaniają się w postaci długich, rurkowatych, bulwiasto zakończonych cytoplazmatycznych uwypukleń, w końcowo zróżnicowanych megakariocytach. Bulwiaste, nabrzmięte zakończenia zawierają peryferyczne pęczki mikrotubul, które skręcają się przybierając formy kłębkowate i łezkowate. Powstałe przedpłytki są dynamicznymi strukturami, a dzięki aktywnym mikrotubulom mogą odwracalnie zmieniać kształt na tubularny czy rozszerzony, a następnie ulegając fragmentacji uwalniać płytki krwi do krążenia [5,23]. Przekształcenie dynamicznej, labilnej struktury przedpłytek, niezbędnej do tworzenia licznych odgałęzień, w sztywne rusztowanie następuje tuż przed uwolnieniem płytek dzięki zespoleniu błony z cytoszkieletem aktynowym. Formowanie gotowych płytek krwi odbywa się w końcowej fazie różnicowania przedpłytek [23].

Niezbędnym warunkiem dla wytwarzania płytek z megakariocytów jest aktywacja kaspaz [8,11,62]. Badania *in vitro* wykazały obecność aktywnych kaspaz 3 i 9 w końcowym stadium dojrzewania megakariocytów [8,62]. Spontaniczna aktywacja

kaspaz, obserwowana w warunkach fizjologicznych, jest niezbędna dla powstania płytek, gdyż wykazano, że inhibitory kaspaz znacznie obniżają tworzenie przedpłytek, a megakariocyty wyrażające silną ekspresję antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (hamujących aktywność kaspaz) mają znacznie zredukowaną zdolność formowania przedpłytek [8,62]. Aktywacja kaspazy 3 powoduje zmiany w podstawowych białkach cytoszkieletu włączonych w proces tworzenia przedpłytek, tj. w miozynie (fosforylacja) i aktynie (polimeryzacja) [62]. Aktywna kaspaza 3 modyfikuje przepuszczalność błony mitochondrialnej. W wyniku otwierania megakanałów dochodzi do uwolnienia z mitochondrium proapoptotycznego cytochromu c, co może sugerować aktywację wewnętrznego, mitochondrialnego szlaku apoptozy [8]. Substratami kaspazy 3 są również inne molekuly, np. gelsolina, Rho-kinaza (powodująca tworzenie pęcherzyków błony komórkowej) i PARP – polimeraza poli (ADP-rybozy) [8]. Wykazano również (*in vitro*), że inhibitor kaspaz ZVAD-fmk (główny inhibitor kaspazy 3) skutecznie blokuje tworzenie przedpłytek [11].

W indukcji apoptozy megakariocytów bezpośrednio związanej z tworzeniem płytek może odgrywać rolę tlenek azotu. Badania *in vitro* potwierdziły również udział tlenu azotu w rozwoju megakariocytów i trombopoecie. Doświadczenia przeprowadzone na szczurach wykazały, że zwierzęta, którym podano L-nitroargininę – inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS, ang. *nitric oxide synthase*), miały obniżoną o 50% liczbę płytek w krążeniu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi [5]. Megakariocyty, wytwarzając płytki niemal równocześnie ulegają apoptozie, która w tym przypadku może odpowiadać za usuwanie starych, „zużytych” megakariocytów [5].

Pedreño i wsp. [47] przedstawili zupełnie nowy, odmienny mechanizm wytwarzania płytek krwi umożliwiający powstawanie płytek bezpośrednio we krwi, a nie, jak dotąd uważano, wyłącznie w szpiku kostnym. Proces ten polega na „wyrzucaniu” ostatecznie dojrzałych płytek wprost do krwi przez megakariocyty znajdujące się w krążeniu, natomiast czynnikiem indukującym jest przypuszczalnie trombina [47].

MODELE APOPTOZY W PŁYTKACH KRWI W WARUNKACH *IN VITRO* I *IN VIVO*

Apoptoza i aktywacja płytek to procesy bardzo podobne pod względem zmian morfologicznych czy biochemicznych. Apoptozę płytek porównywano także z procesem uszkodzenia płytek podczas ich przechowywania [58]. Do tej pory opisano 5 zjawisk modelowych, demonstrujących apoptozę w płytkach, w tym 3 modele przedstawiające apoptozę *in vitro* i 2 *in vivo*.

W płytkach w warunkach *in vitro* obserwowano:

- apoptozę indukowaną niefizjologicznymi agonistami – wapniowym jonoforem jonomycyny [64] i A23187 [36,59,68], jak i fizjologicznymi agonistami płytek: trombiną, kolagenem, mieszaniną trombiny i kolagenu, analogiem tromboksanu A₂ – U46619 [59,68];

- apoptozę, do której dochodzi w procesie starzenia płytek podczas przechowywania przemytych płytek (płytek inkubowanych przez 18–24 godzin w temp. 37°C) [10];
- apoptozę indukowaną starzeniem się koncentratów płytkowych o niskiej zawartości leukocytów (PCs, ang. *leukodepleted platelet concentrates*) w warunkach standardowego przechowywania płytek w temp. 22°C [36,49,53] i 37°C [29].

W płytkach, w warunkach *in vivo* obserwowano: apoptozę powiązaną ze starzeniem płytek u psów z trombopoezą tłumioną estradiolem (podawanym w iniekcjach) [48] oraz apoptozę w płytkach myszy z trombocytopenią wywołaną infekcją malarii [50] i indukowaną przez iniekcje czynnika martwicy nowotworu (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) [51] lub przeciwciał przeciwplateletowych [52].

MARKERY APOPTOZY PŁYTEK KRWI PODCZAS ICH PRZECHOWYWANIA

Wyizolowane z krwi płytki podczas przechowywania ulegają licznym zmianom, które powodują upośledzenie ich prawidłowej struktury i funkcji. Te morfologiczne-metaboliczne zaburzenia ograniczają możliwość przechowywania płytek i mogą być przyczyną osłabionej rekonwalescencji pacjenta po transfuzji masy płytkowej [49]. Pojawiające się modyfikacje płytek są określane jako: 1) defekt przechowywanych płytek PSD (ang. *platelet storage defect*) [49]; 2) uszkodzenie przechowywanych płytek PSL (ang. *platelet storage lesion*) [58]. Zaobserwowano również, że wraz z wydłużeniem okresu przechowywania płytek w warunkach *in vitro* maleje ich przeżywalność i dochodzi do nasilenia zmian morfologicznych i biochemicznych (zarówno w podwyższonej temperaturze (37°C), jak i w standardowych warunkach przechowywania krwi w temperaturze 20–24°C) [6,34,36,49,58,67]. Zaburzenia opisywane jako uszkodzenia typu PSL pojawiają się w odpowiedzi na stres mechaniczny, hipoksję oraz obniżoną lub podwyższoną temperaturę. Uszkodzenia typu PSL prowadzą do tworzenia mikroplatek, reorganizacji cytoszkieletu i ekspozycji PS. Wymienione zmiany morfologiczne i biochemiczne towarzyszące temu uszkodzeniu płytek odpowiadają właściwościom apoptotycznej śmierci, ale również aktywacji płytek krwi, w związku z czym pojawia się wątpliwość czy uszkodzenia typu PSL są równe apoptozie [58].

Chociaż prawidłowy czas życia płytek w krążeniu oceniono na około 10 dni, w warunkach pozaustrojowych już po pięciu dniach w temp. 22°C pojawiają się oznaki apoptozy, takie jak: ekspozycja PS, podwyższenie poziomu ekspresji mRNA dla prokaspazy, receptorów śmierci i białek Bcl-2, wytworzenie aktywnej cząsteczki kaspazy 3 (p17) i rozpad gelsoliny [34,36,49]. Przechowywane płytki są również bardziej wrażliwe na bodźce apoptotyczne, w tym na działanie agonistów (jonofor wapniowy, trombina, kolagen) [49]. Przeżywalność płytek krwi wyraźnie maleje podczas ich przechowywania w temp. 37°C, przy dodatkowym zwiększonym ryzyku zanieczyszczenia bakteriami. Dla płytek krwi temperatura 37°C została uznana za temperaturę stresową, indukującą apoptozę. O ile temperatura 22°C redukuje żywotność płytek dopiero po pięciu dniach,

w temperaturze 37°C zanik prawidłowych funkcjonalnych cech płytek w warunkach *in vitro* obserwowano już po 24 godzinach. Po trzech godzinach dochodzi do wzrostu aktywności kaspazy 3 (osiągającej maksimum po 48 godzinach), a między 6 a 9 godziną do pojawienia się aktywnej formy kaspazy 9 [6]. Innymi przejawami uruchomienia apoptotycznej maszyny w płytkach przechowywanych (w temp. 37°C) jest rozpad gelsoliny, obniżenie poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-X_L, ekspozycja na powierzchni PS i uwolnienie cytochromu c [6,34,67]. Sugeruje się także, że indukcja apoptozy płytek krwi w temp. 37°C może być spowodowana niedoborem metabolicznie ważnych substratów, sekrecją lub akumulacją czynników proapoptotycznych [6]. Płytki inkubowane przez trzy godziny *in vitro* w temp. 37°C zużywają tlen dwukrotnie szybciej niż w temperaturze 22°C [21]. Zwiększenie tempa przemian metabolicznych i zużycia substratów metabolicznych przyczyniać się może do skrócenia czasu życia płytek. Ciągłe jednak pozostaje zagadką, dlaczego w warunkach *in vivo* płytki krwi w temp. 37°C żyją 8–10 dni, podczas gdy w warunkach *ex vivo* tracą żywotność po dwóch dniach [6].

UWAGI KOŃCOWE

Istnieje hipoteza, że apoptoza i aktywacja płytek to prawdopodobnie ten sam proces [63,68]. Hipoteza ta uwzględnia wspólne cechy morfologiczne i biochemiczne apoptozy i aktywacji, takie jak: zmiana kształtu płytki, modyfikacja cytoszkieletu, fuzja ziarnistości z błoną plazmatyczną, tworzenie pęcherzyków błony, uwolnienie mikropłytek, ekspozycja na powierzchni fosfatydyloseryny [6,33,34,49,67,68]. Wydaje się jednak, że nie ma znaku równości między apoptozą a aktywacją płytek krwi (tab. 3). Większość danych eksperymentalnych wskazuje na odmiennność tych dwóch procesów. Przemieszczają za tym przede wszystkim typowe zjawiska apoptotyczne, których nie obserwuje się w czasie aktywacji płytek, a do których zalicza się spadek potencjału wewnątrz-błonowego mitochondriów $\Delta\Psi_m$, uwolnienie cytochromu c, wzrost ekspresji proapoptotycznych białek Bcl-2 oraz obecność aktywnej kaspazy 3 i 9 [6,10,33,34,36,48,49,59,63,67,68]. W procesie apoptozy płytek nie zaobserwowano ani adhezji płytek do komórek śródbłonna, ani zwiększonego metabolizmu inozytoli czy fosforylacji wtórnych przekazników białkowych [68]. Dodatkowym elementem różniącym wspomniane procesy jest szybkość ich przebiegu i pojawiania się charakterystycznych cech, tzn. w aktywacji płytek zmiany pojawiają się gwałtownie i niemal natychmiast, podczas gdy odpowiedź płytek na bodziec apoptotyczny przebiega wolniej [49,68]. Wiele wątpliwości i sprzeczności wzbudza udział kaspaz i kalpain w tych procesach. Kaspazy są powszechnie uznawane za głównych wykonawców apoptozy, nie tylko w komórkach jądrzastych, ale również w płytkach krwi [12,33,34,36,44]. Znacznie mniejszą rolę przypisuje się kalpainom, jak dotąd aktywnym jedynie w modelu apoptozy płytek indukowanej silnymi agonistami [34,68]. Chociaż kalpains zostały uznane za znaczniki płytkowej apoptozy [34], ich funkcja jest znacznie lepiej udowodniona w procesie aktywacji, w którym nie

TABELA 3. Zmiany morfologiczne i biochemiczne towarzyszące aktywacji i apoptozie płytek krwi

Aktywacja płytek krwi	Apoptoza płytek krwi
Tworzenie mikropłytek Ekspozycja osfatydyloseryny Reorganizacja białek cytoszkieletu (udział kalpain)	tworzenie mikropłytek ekspozycja fosfatydyloseryny reorganizacja białek cytoszkieletu (udział kaspazy 3 i 9, kalpain) obecność ligandów śmierci obecność receptorów śmierci obecność białek adaptorowych obecność rodziny białek Bcl-2 zmiany potencjału transbłonowego mitochondriów

biorą udziału aktywne kaspazy. Wolf i wsp. [68] przedstawili trzy dowody potwierdzające udział kalpain a nie kaspaz w aktywacji płytek: 1) apoptoza, a nie aktywacja jest skorelowana z procesem aktywacji kaspaz; 2) zdarzeniom apoptozopodobnym podczas stymulowania płytek A23187 zapobiega inhibicja kalpain a nie kaspaz; 3) w czasie aktywacji płytek nie dochodzi do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c jako kluczowego elementu aktywacji kaspaz (szlak mitochondrialny).

Na obecnym poziomie wiedzy można przypuszczać, że przebieg procesu apoptozy w płytkach krwi na szlaku zewnętrznym czy wewnętrznym w znacznym stopniu zależy od rodzaju czy siły induktora apoptozy. Zastosowanie w badaniach megakariocytów (jądrzastych prekursorów płytek krwi) czy megakariocytycznych linii komórkowych powinno zwiększyć postęp wiedzy o szlakach procesu apoptozy i ich regulacji w płytkach krwi.

LITERATURA

- [1] ABRAMS CS, BRASS LF. Platelet signal transduction. W: RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes, JN George [red.] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA, Chapter 31, 2001: 541–559.
- [2] AMOR NB, PARIENTE JA, SALIDO GM, BARTEGI A, ROSADO JA. Caspases 3 and 9 are translocated to the cytoskeleton and activated by thrombin in human platelets. Evidence for the involvement of PKC and the actin filament polymerization. *Cell Signal* 2006; **18**: 1252–1261.
- [3] AUGEREAU O, ROSSIGNOL R, DEGIORGI F, MAZAT JP, LETELLIER T, DACHARY-PRIGENT J. Apoptotic-like mitochondrial events associated to phosphatidylserine exposure in blood platelets induced by local anaesthetics. *Thromb Haemost* 2004; **92**: 104–113.
- [4] BARTOSZ G. Rola reaktywnych form tlenu w apoptozie. *Post Bioch* 1998; **44**: 22–31.
- [5] BATTINELLI E, WILLOUGHBY SR, FOXALL T, VALERI, CR, LOSCALZO J. Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Cell Biol* 2001; **98**: 14458–14463.
- [6] BERTINO AM, QI XQ, LI J, XIA Y, KUTER DJ. Apoptotic markers are increases in platelets stored at 37°C. *Transfusion* 2003; **43**: 857–866.
- [7] BLOCKMANS D, DECKMYN H, VERMYLEN J. Platelet activation. *Blood Rev* 1995; **9**: 143–156.
- [8] BOTTON S, SABRI S, DAUGAS E, ZERMATI Y, GUIDOTTI JE, HERMINE O, KROEMER G. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood* 2002; **100**: 1310–1317.

- [9] BROWN AS, MORO MA, MASSE JM, CRAMER EM, RADOMSKI M, DARLEY-USMAR V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc Res* 1998; **40**: 380–388.
- [10] BROWN SB, CLARKE MCH, MAGOWAN L, SANDERSON H, SAVIL J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase independent cell clearance program. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5987–5996.
- [11] CLARKE MCH, SAVILL J, JONES DB, NOBLE BS, BROWN SB. Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. *J Cell Biol* 2003; **160**: 577–587.
- [12] COHEN Z, WILSONC J, RITTERB L, MCDONAGHA P. Caspase inhibition decreases both platelet phosphatidylserine exposure and aggregation. Caspase inhibition of platelets. *Thromb Res* 2004; **113**: 387–393.
- [13] CRAMER EM. Platelets and megakaryocytes: anatomy and structural organization. W: RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes, JN George [red.] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA, Chapter 22, 2001: 411–428.
- [14] CRIST SA, ELZEY BD, LUDWIG AT, GRIFFITH TS, STAACK JB, LENTZD SR, RATLIFF TL. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2004; **32**: 1073–1081.
- [15] DECKHUZYEN MC. Über die Thrombocyten (Blutplättchen). *Anat Anz* 1901; **19**: 529.
- [16] DEL PRINCIPE D, MENICHELLI A, DE MATTEIS W, DI CORPO ML, DI GIULIO S, FINAZZI-AGRO AF. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Lett* 1985; **1**: 142–149.
- [17] DEL PRINCIPE D, MENICHELLI A, DE MATTEIS W, DI GIULIO S, GIORDANI M, SAVINI I, FINAZZI-AGRO AF. Hydrogen peroxide is an intermediate in the platelet activation cascade triggered by collagen, but not by thrombin. *Thromb Res* 1991; **62**: 365–371.
- [18] FINAZZI-AGRO AF, MENICHELLI A, PERSIANI M, BIANCINI G, DEL PRINCIPE D. Hydrogen peroxide release from human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1982; **718**: 21–25.
- [19] FORDE RC, FITZGERALD DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation* 1997; **95**: 787–789.
- [20] GOLDKORN T, BALABAN N, SHANNON M, CHEA V, MATSUKUMA K, GILCHRIST D, WANG H, CHAN C. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signalling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 1998; **111**: 209–322.
- [21] GUNSON H, HOLME S, HEATON A. *In vitro* platelet ageing at 22 degrees C is reduced compared to *in vivo* ageing at 37 degrees C. *Br J Haemat* 1995; **91**: 212–218.
- [22] HAMPTON MB, ORRENIUS S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 1997; **414**: 552–556.
- [23] ITALIANO JE, LECINE P, SHIVDASANI RA, HARTWIG JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; **147**: 1299–1312.
- [24] IULIANO L, COLAVITA AR, LEO R, PRACTICO D, VIOLI F. Oxygen free radicals and platelet activation. *Free Rad Biol Med* 1997; **22**: 999–1006.
- [25] IULIANO L, PEDERSEN JZ, PRACTICO D, ROTILIO G, VIOLI F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 695–704.
- [26] JAHN B, HANSCH GM. Oxygen radical generation in human platelets: dependence of 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **93**: 73–79.
- [27] KALUZHNY Y, RAVID K. Role of apoptotic processes on platelet biogenesis. *Acta Haematol* 2004; **111**: 67–77.
- [28] KROLL MH, SCHAFER AJ. The analysis of ligand-receptor interaction in platelet activation. *Immunopharmacology* 1995; **29**: 31–65.
- [29] KUTER DJ. Apoptosis in platelets during *ex vivo* storage. *Vox Sang* 2002; **83**: 311–333.
- [30] LAI M, RUMI C, D'ONOFRIO G, PUGGIONI PL, MENICHELLA G. Phosphatidylserine exposure in platelet concentrates during the storage period: differences between the platelets collected with different cell separators. *Transfus Apheresis Sci* 2002; **27**: 239–245.
- [31] LEO R, GHISELLI A, IULIANO L, VIOLI F. Role of hydroxyl radicals by the salicylate bis-hydroxylation during arachidonic acid-dependent platelet activation. *Thromb Haemost* 1995; **73**: A–47.
- [32] LEVY-TOLEDANO S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a hierarchy? *Haemost* 1999; **29**: 4–15.

- [33] LEYTIN V, ALLEN DJ, MYKHAYLOV S, MIS L, LYUBIMOV EV, GARVEY B, FREEDMAN J. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 2004; **320**: 303–310.
- [34] LEYTIN V, FREEDMAN J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apheresis Sci* 2003; **28**: 285–295.
- [35] LI J, KUTER DJ. The end is just the beginning: megakaryocyte apoptosis and platelet release. *Int J Hematol* 2001; **74**: 365–374.
- [36] LI J, XIA Y, BERNITO AM, COBURN JP, KUTER DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* 2000; **40**: 1320–1329.
- [37] LUFRANO M, BALAZY M. Interactions of peroxynitrite and other nitrating substances with human platelets: the role of glutathione and peroxynitrite permeability. *Biochem Pharmacol* 2003; **65**: 515–523.
- [38] MARCUS AJ, SILK ST, SAFIER LB, ULLMANN HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. *J Clin Invest* 1997; **59**: 149–158.
- [39] MARESCA M, COLAO C, LEONCINI G. Generation of hydrogen peroxide in resting and activated platelets. *Cell Biochem Funct* 1992; **10**: 79–82.
- [40] MATSUBAYASHI H, WEIDNER J, MIRAGLIA CC, MCINTYRE JA. Platelet membrane early activation markers during prolonged storage. *Thromb Res* 1999; **93**: 151–160.
- [41] MEHTA JL, CHEN LY, KONE BC, MEHTA P, TURNER P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; **125**: 370–377.
- [42] MORO MA, DARLEY-USMAR VM, GOODWIN DA, READ NG, ZAMORA-PINO R, FEELISCH M, RADOMSKI MW, MONCADA S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrate on human platelets. *Pharmacology* 1994; **91**: 6702–6706.
- [43] MORO MA, DARLEY-USMAR VM, LIZASOAIN I, SU Y, RADOMSKI WM, MONCADA S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol* 1995; **116**: 1999–2004.
- [44] MOTOYAMA N, KIMURA T, TAKAHASHI T, WATANABE T, NAKANO T. Bcl-X_L prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med* 1999; **189**: 1691–1698.
- [45] OLAS B, WACHOWICZ B. Aktywacja płytek krwi; Mechanizm przekazywania sygnałów. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 359–378.
- [46] OLAS B, WACHOWICZ B. Rola reaktywnych form tlenu w płytkach krwi. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 325–337.
- [47] PEDRENO J, MONCUSÍ M, CABRÉ A, MASANA L. A new mechanism for platelet formation. *Atherosclerosis* 2000; **151**: 2–3.
- [48] PEREIRA J, SOTO M, PALOMO I, OCQUETEAU M, COETZEE L-M, ASTUDILLO S, ARANDA E, MEZZANO D. Platelet aging *in vivo* is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost* 2002; **87**: 905–909.
- [49] PERROTTA PL, PERROTTA CL, SNYDER EL. Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion* 2003; **43**: 526–535.
- [50] PIQUET PF, KAN CD, VESIN C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis* 2002; **7**: 91–98.
- [51] PIQUET PF, VESIN C, KAN CD. Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics. *Cytokine* 2002; **18**: 222–230.
- [52] PIQUET PF, VESIN C. Modulation of platelet caspases and life-span by anti-platelet antibodies in mice. *Eur J Haematol* 2002; **68**: 253–261.
- [53] PLENCHETTE S, MOUTET M, BENGUELLA M, N'GONDARA JP, GUIGNER F, COFFEE C, CORCOS L, BETTAIEB A, SOLARY E. Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion. *Leukemia* 2001; **15**: 1572–1581.
- [54] RYNINGEN A, HOLMSEN H. W: Gundu H., Rao R. [red.] Platelet Physiology and Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Norwell, 1999: 1–22.
- [55] SALVEMINI D, BOTTING R. Modulation of platelet function by free radicals and free radicals scavengers. *TIPS* 1993; **14**: 36–42.
- [56] SANZ C, BENET I, RICHARD C, BADIA B, ANDREU EJ, PROSPER F, FERNANDEZ-LUNA JL. Antiapoptotic protein Bcl-X_L is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol* 2001; **29**: 728–735.

- [57] SCHICK PK. W: RW. Colman, J. Hirsh, VJ. Marder, AW. Clowes, JN. George [red.] Hemostasis and thrombosis, basic principles and clinical practice. 4th Edition, Lippincott Williams and Willins, Philadelphia, USA, 2001: 521–532.
- [58] SEGATCHIAN J, KRAILADSIRI P. Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? *Transfus Apheresis Sci* 2001; **24**: 103–105.
- [59] SHCHERBINA A, REMOLD-O'DONNELL E. Role of caspases in a subset of human platelet activation responses. *Blood* 1999; **93**: 4222–4231.
- [60] SMUGAR J. Rozpoznanie i usuwanie komórek apoptotycznych przez profesjonalne fagocyty. *BioInfo publications*; <http://bioinfo.mol.uj.pl>, 2004
- [61] STASSEN JM, ARNOUT J, DECKMYN H. The hemostatic system. *Curr Med Chem* 2004; **11**: 2245–2260.
- [62] TESTA U. Platelet formation: a link between apoptosis and differentiation. *Blood* 2002; **100**: 1111–1112.
- [63] TONON G, JUO X, GRECO NJ, CHEN W, SHI Y, JAMIESON GA. Weak platelet agonists and U46619 induce apoptosis-like events in platelets, in the absence of phosphatidylserine exposure. *Thromb Res* 2002; **107**: 345–350.
- [64] VANAGS DM, ORRENIUS S, AGUILAR-SANTELIES M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br J Haematol* 1997; **99**: 824–831.
- [65] VIOLI F, GHISELLI A, IULIANO L, ALESSANDRI C, CORDOVA C, BALSANO F. Influence of hydroxyl radical scavengers on platelet function. *Haemost* 1988; **18**: 91–98.
- [66] WACHOWICZ B, OLAS B, ŻBIKOWSKA HM, BUCZYŃSKI A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 2002; **13**: 175–182.
- [67] WADHAWAN V, KARIM ZA, MUKHOPADHYAY S, GUPTA R, DIKSHIT M, DASH D. Platelet storage under *in vitro* condition is associated with calcium-dependent apoptosis-like lesions and novel reorganization in platelet cytoskeleton. *Arch Biochem Biophys* 2004; **422**: 183–190.
- [68] WOLF BB, GOLSTEIN JC, STENNICE HR, BEERE H, AMARANTE-MENDES GP, SALVESAN GS, GREEN DR. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood* 1999; **94**: 1683–1692.
- [69] WU K. Platelet activation mechanisms and marker in arterial thrombosis. *J Intern Med* 1996; **239**: 17–34.
- [70] WU KK, KU CSL. Effect of platelet activation on the platelet surface sialic acid. *Thromb Res* 1979; **14**: 697–704.
- [71] ZAULI G, VITALE M, FALCIERI E, GIBELLINI D, BASSINI A, CELEGHINI C, COLUMBARO M, CAPITANI S. *In vitro* senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. *Blood* 1997; **90**: 2234.
- [72] ZHOU Q, HELLERMAN GR, SOLOMONSON LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res* 1995; **77**: 87–96.
- [73] ZWAAL RF, SCHROIT AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; **89**: 1120–1121.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 22.05. 2006 r.

Przyjęto: 19.07. 2006 r.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,

e-mail: wachbar@biol.uni.lodz.pl