

Barbara Wachowicz

RECEPTORY PURYNOWE NA PŁYTKACH KRWI

W pracy przedstawiono współczesne poglądy na nomenklaturę i klasyfikację receptorów purynowych. Zewnątrzkomórkowe nukleotydy adeninowe, poprzez oddziaływanie z receptorami purynowymi typu P_2 , regulują różnorodne procesy fizjologiczne. Początkowo wyodrębniono pięć typów receptorów purynowych P_{2X} , P_{2Y} , P_{2T} , P_{2U} , P_{2Z} . Receptory P_{2T} obecne na powierzchni płytek krwi są odpowiedzialne za złożony proces aktywacji płytek indukowanej ADP. Sklonowanie receptorów purynowych spowodowało zmiany w klasyfikacji i nazewnictwie tych receptorów. Na powierzchni płytek krwi są obecne receptory P_{2Y1} (metabotropowe) związane z białkiem G odpowiedzialne za hamowanie cykazy adenylowej i indukowanie agregacji oraz receptory P_{2X1} (jonotropowe) uczestniczące w napływie jonów wapnia do płytki.

WSTĘP

Po raz pierwszy biologiczne działanie nukleotydów adeninowych (ATP) na komórki opisane zostało przez Drury i Szent-Gyorgi w 1929 r. [12]. Obecnie wiadomo, że zewnątrzkomórkowe nukleotydy i nukleozydy adeninowe, poprzez oddziaływanie z powierzchniowymi specyficznymi receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek, regulują różnorodne procesy fizjologiczne, m. in. agregację płytek krwi, skurcz i rozkurcz naczyń krwionośnych, pracę serca, neurotransmisję czy też podziały komórkowe [18]. Te receptory określa się jako receptory purynowe P (purynoceptory, receptory purynergiczne). Receptory wiążące różne nukleotydy adeninowe zalicza się do receptorów typu P_2 , aby odróżnić je od receptorów dla adenozyiny, znanych jako receptory purynowe typu P_1 (receptory A). Klasę receptorów P_2 po raz pierwszy wyodrębnił Burnstock w 1978 r. [7]. Receptory P_1 są obecne na komórkach różnych tkanek, w tym na komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich, komórkach nabłonka i komórkach krwi. Klasyfikacja i nomenklatura receptorów purynowych budzi liczne kontrowersje. Na podstawie różnicującego działania farmakologicznego

licznych analogów ATP i ADP jako agonistów, wyodrębniono receptory P_{2X} , P_{2Y} , P_{2T} , P_{2Z} i P_{2U} [8, 18, 39]. Dodatkową grupę stanowią receptory P_{2D} rozpoznające polifosforany diadenozyny [28].

Klasyfikacja receptorów P_2 napotyka na trudności ze względu na brak selektywnych antagonistów dla receptorów P_2 ; ponadto zewnątrzkomórkowy ATP jest gwałtownie metabolizowany przez nukleotydazy i ATPazy powszechnie występujące i określane jako ektonukleotydazy [39].

Burnstock i Kennedy [8], na podstawie różnej odpowiedzi farmakologicznej komórek mięśni gładkich na działanie analogów ATP i ADP, wyodrębnili podklasy receptorów P_{2X} i P_{2Y} , których agonistami są ADP i ATP. Podklasa receptorów P_{2X} odpowiadała za inicjowanie skurczu mięśni gładkich wywołanych ATP, natomiast receptorów P_{2Y} za działanie rozkurczające mięśni gładkich. Receptory P_{2T} występujące na powierzchni płytek krwi są odpowiedzialne za agregację płytek wywołaną wyłącznie ADP. Receptory P_{2Z} znajdują się na komórkach tucznych i makrofagach, ich agonistą jest ATP, natomiast receptory P_{2U} inicjują odpowiedź komórek zarówno na ATP jak i UTP [13, 18]. Miras-Portugal i wsp. [28] wyodrębnili jeszcze jedną grupę receptorów purynowych obecnych na komórkach chromochłonnych rozpoznających polifosforany diadenozyny. Receptory specyficzne dla polifosfodiadenozyny nazwali receptorami P_4 lub P_{2D} .

Sklonowanie receptorów purynowych [25, 38] i badania ich struktury spowodowały odkrycie dodatkowych podtypów receptorów purynowych, reorganizację ich nomenklatury i klasyfikacji.

Obecnie wszystkie receptory purynowe P_2 dzieli się na dwie główne grupy: 1) receptory należące do tzw. nadrodziny receptorów metabotropowych (serpentyńowych) charakteryzujących się obecnością siedmiu domen transbłonowych i związanych z białkiem G, które określa się jako receptory purynowe P_{2Y} , oraz 2) receptory P_{2X} wchodzące w skład nadrodziny receptorów jonotropowych i działające jako receptory kanału jonowego [1, 9]. Od sklonowania pierwszego receptora purynowego w 1993 r. [38] zidentyfikowano 7 podtypów receptorów P_{2X} (P_{2X1} – P_{2X7}), których ligandem jest ATP [9] oraz 8 podtypów receptorów P_{2Y} (P_{2Y1} – P_{2Y8}) rozpoznawanych przez nukleotydy adeninowe i urydynowe. Analiza mRNA dla receptorów P_2 wskazuje na powszechne występowanie receptorów purynowych na większości komórek różnorodnych tkanek, potwierdzając ich istotną rolę w procesach fizjologicznych.

Wiele receptorów purynowych sklasyfikowano i opisano głównie na podstawie danych farmakologicznych.

RECEPTORY PURYNOWE A AKTYWACJA PŁYTEK KRWI

Płytki krwi, dzięki wyjątkowo rozwiniętemu systemowi receptorów na błonie, reagują na różnorodne bodźce, ulegają aktywacji i spełniają swoją określoną rolę w hemostazie. Receptory biorące udział w aktywacji płytek mają różną budowę i charakteryzują się też różnym mechanizmem działania. Wyróżnia się receptory metabotropowe (serpentinowe), które posiadają siedem transbłonowych domen i są związane z białkiem G (m. in. receptor dla trombiny, tromboksanu A_2) oraz receptory białek adhezyjnych, a więc integryny, selektyny i glikoproteiny GP IV i GPIb-IX. Integryny są receptorami o największym znaczeniu fizjologicznym, są najlepiej poznane (integryna dla fibrynogenu) i występują licznie na powierzchni płytek. Wszystkie typy receptorów inicjują i biorą udział w przesyłaniu sygnału do wnętrza płytek, uruchamiając ciągi reakcji biochemicznych (m. in. z udziałem kinaz, fosforylacji, reorganizacji cytoszkieletu), prowadząc do aktywacji – agregacji, adhezji, procesu sekrecyjnego czy retrakcji skrzepu. Najlepiej poznane są receptory dla silnych agonistów płytek – trombiny, kolagenu czy tromboksanu A_2 .

ADP jest naturalnym, pierwszym opisanym agonistą płytek krwi [14, 15, 18, 20, 22]. ATP należy do jego kompetycyjnych antagonistów. Znajdujące się w krwioobiegu zewnątrzkomórkowe nukleotydy adeninowe pochodzą z uszkodzonych komórek, głównie erytrocytów i komórek śródbłonna oraz z pobudzonych płytek krwi. ADP odgrywa istotną rolę w aktywacji płytek krwi. Znajduje się w bardzo dużym stężeniu w ziarnistościach gęstych płytek krwi, gdzie magazynowany razem z ATP stanowi pulę niemetaboliczną nukleotydów adeninowych [21]. Jest uwalniany na drodze egzocytozy, kiedy dochodzi do pobudzenia płytkowego procesu sekrecyjnego w wyniku działania silnych fizjologicznych agonistów, takich jak trombina czy kolagen. Pochodzący z płytek ADP jest czynnikiem autokrynnym i wzmacnia ich agregację.

Już na początku lat sześćdziesiątych stwierdzono, że czynnikiem wywołującym adhezję i agregację płytek krwi jest adenozynodifosforan pochodzący z erytrocytów [14, 20]. Dodanie ADP do przemytych płytek powoduje zmianę ich kształtu, ekspozycję integrynowego receptora $\alpha_{IIb}\beta_3$ dla fibrynogenu, przyłączenie fibrynogenu, odwracalną agregację w obecności fizjologicznych stężeń Ca^{2+} . *In vitro*, proces agregacji płytek jest rejestrowany przy użyciu agregometru. Można wyróżnić dwufazowy proces agregacji. Pierwsza faza wynika z bezpośredniej aktywacji płytek. W wyniku reakcji uwalniania zachodzącej w pobudzonych płytkach, w otoczeniu płytek pojawiają się związki uwalniane z płytkowych ziarnistości (w tym ADP) oraz syntezowane z arachidonianu (tromboksan A_2). Uwolniona pula agonistów wywołuje drugą fazę agregacji. Brak drugiej fazy agregacji może wynikać z zaburzenia przekazywania sygnałów w płytkach krwi. Aktywacja płytek krwi wywołana

ADP prowadzi do natychmiastowego i przejściowego wzrostu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie komórek równocześnie z zahamowaniem aktywności cyklazy adenylowej [15, 29, 36]. Stymulowanie płytek ADP powoduje też uaktywnienie kanałów wapniowych znajdujących się w błonie płytkowej i napływ jonów wapnia z osocza do cytoplazmy płytek. Drugim źródłem jonów wapnia są zasoby wewnątrzkomórkowe zmagazynowane w układzie tubuli (ang. *dense tubular system* DTS). Jak ADP stymuluje uwalnianie jonów wapnia z wewnątrzkomórkowego źródła – jeszcze nie wyjaśniono. ADP powoduje wyjątkowo gwałtowny napływ jonów wapnia ze środowiska [33] przypuszczalnie przy udziale receptorów purynowych P_{2X1} [26]. Podczas gdy większość agonistów stymuluje fosfolipazę C (PLC) i w następstwie generuje inozytolotrifosforan IP_3 , nie jest jasne, czy ADP działa w podobny sposób [19]. ADP hamuje cyklazę adenylową w płytkach krwi [29]. Wywołuje również reorganizację białek cytoszkieletu i przyłączenie aktyny, białka wiążącego aktynę, miozyny, α -aktyniny, taliny i winkuliny. Reorganizacji cytoszkieletu towarzyszy wzrost regulatorowej podjednostki p85 kinazy fosfatydyloinozytolu PI-3. Odwracalność agregacji może wynikać z braku aktywacji kinazy PI-3 i produkcji fosfatydyloinozytofosforanów $PtdIns(3,4)P_2$ czy $PtdIns(3,4,5)P_3$. W przeciwieństwie do stymulacji trombinowej po działaniu ADP obserwuje się tylko nieznaczną translokację białka Rho do cytoszkieletu przy translokacji pp60 c-src i kinazy FAK, co może sugerować, że białko Rho nie jest wciągnięte w aktywację ludzkich płytek indukowaną ADP [17].

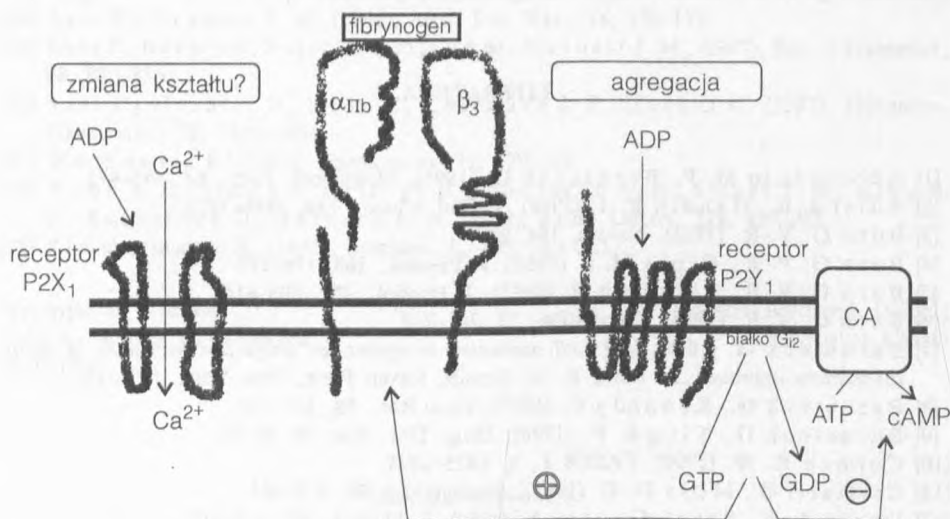
Istotne znaczenie w badaniach aktywacji płytek indukowanej ADP miały pionierskie prace Borna prowadzone w latach sześćdziesiątych [3, 4, 6], a w szczególności wprowadzenie turbidymetrycznej metody badania agregacji i zmiany kształtu płytek [27]. Już w latach siedemdziesiątych wykazano, że istnieją 2 rodzaje miejsc receptorowych o różnym powinowactwie do ADP [2, 5, 31]. Jądrzaste trombocyty ptaków, podobnie jak płytki ssaków, charakteryzują się również obecnością receptorów dla ADP [37].

Mimo intensywnych badań, do chwili obecnej nie potwierdzono, które z proponowanych białek płytkowych może pełnić funkcję receptora dla ADP: o masie 28 kDa, 43 kDa, 61 kDa [2, 11], czy białko o masie cz. 100 kDa zwane agreginą [10]. Próby sklonowania specyficznego receptora odpowiedzialnego za agregację płytek nie zakończyły się jeszcze sukcesem. Badania ostatnich lat wydają się potwierdzać, że na płytkach krwi może występować nie tylko jeden rodzaj receptora rozpoznającego ADP [15, 16, 30]. Receptory purynowe na płytkach są nieswoiste; rozpoznają zarówno ADP, jak i ATP.

Wśród receptorów purynowych dla ADP na powierzchni płytek, określanych wcześniej jako receptory P_{2T} , ze względu na strukturalną budowę i funkcję, wyróżnia się receptor metabotropowy typu P_{2Y1} [24, 30], który odgrywa istotną rolę w aktywacji płytek indukowanej ADP, przede wszystkim

w agregacji i hamowaniu cyklazy adenylowej oraz receptor jonotropowy P_{2X1} odpowiedzialny za gwałtowny napływ jonów wapnia do cytoplazmy [33–36]. Ze względu na połączenie receptora metabotropowego z białkiem G_i o podjednostce α_{i2} , Leon i wsp. [24] sugerują, że jednym z receptorów dla ADP na powierzchni płytek krwi i komórek megakarioblastycznych jest receptor P_{2Y1} . Jego antagonistą jest ATP.

Obecność mRNA dla receptora jonotropowego P_{2Y1} w płytkach i komórkach linii megakarioblastycznych wykazali Vial i wsp. [36] stosując metodę PCR i potwierdzili udział receptora P_{2X1} w funkcjonowaniu płytek krwi. Ten receptor inicjuje zmianę kształtu i napływ jonów wapnia ze środowiska do cytoplazmy komórek. Agonistą jest nie tylko ADP, ale też ATP. Model receptorów purynowych obecnych na powierzchni płytek krwi dla ADP i proponowana ich funkcja fizjologiczna jest przedstawiona na rys. 1.



Rys. 1. Schemat przedstawiający budowę i rolę receptorów purynowych na płytce krwi (zmodyfikowany wg [16])

Na płytkach krwi znajdują się również receptory dla adenozyiny typu A_{2a} . Adenozyina stymulując cyklazę adenylową powoduje wzrost cAMP w płytkach i w ten sposób hamuje ich aktywację [23]. Ponieważ ADP uwalniany z płytek jest degradowany do adenozyiny przez ektonukleotydazy na komórkach śródbłonna, może to stanowić ważny mechanizm ograniczający nadmierną agregację w nienaruszonej ścianie naczynia krwionośnego.

Nie wiadomo jeszcze, czy na powierzchni płytek krwi są obecne receptory dla polifosforanów diadenozyiny. Trifosforan diadenozyiny ($Ap3A$)

i tetrafosforan diadenozyny (Ap4A) znajduje się w ziarnistościach płytek o dużej gęstości elektronowej, razem z nukleotydami adeninowymi uwalnianymi w procesie sekrecyjnym [28].

Nukleotydy adeninowe uwolnione z pobudzonych płytek mogą odgrywać pewną rolę w miejscu uszkodzenia ściany naczynia. Obecne na komórkach śródbłonna receptory P_{2Y1} inicjują rozkurcz naczynia, podczas gdy receptory purynowe inicjujące skurcz naczynia (P_{2X1}) są wyeksponowane na komórkach mięśni gładkich i dostępne dla nukleotydów adeninowych po uszkodzeniu czy usunięciu komórek śródbłonna. Dlatego też w miejscu uszkodzenia ściany naczynia system receptorów purynowych na różnych komórkach uczestniczy, obok innych mechanizmów, w regulowaniu hemostazy. Selektywna interwencja farmakologiczna poprzez określone receptory purynowe (stosowanie leków ticlopidine czy clopidogrel, które *ex vivo* są silnymi inhibitorami agregacji płytek indukowanej ADP) może mieć istotne znaczenie w leczeniu zaburzeń procesu hemostazy i aktywacji płytek krwi.

LITERATURA

- [1] Abbracchio M. P., Burnstock G. (1994), *Pharmacol. Ther.*, **64**, 445–475.
- [2] Adler J. R., Handin R. I. (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3866–3872.
- [3] Born G. V. R. (1962), *Nature*, **194**, 927.
- [4] Born G. V. R., Cross M. J. (1965), *J. Physiol.*, **168**, 178–195.
- [5] Born G. V. R., Feinberg H. (1975), *J. Physiol.*, **251**, 803–816.
- [6] Born G. V. R. (1985), *Circulation*, **72**, 741–742.
- [7] Burnstock G. (1978), [w:] *Cell membrane receptors for drugs and hormones; a multidisciplinary approach*, L. Bolis, R. N. Straub, Raven Press, New York, 107–118.
- [8] Burnstock G., Kennedy C. (1985), *Circ. Res.*, **58**, 319–330.
- [9] Burnstock G., King B. F. (1996), *Drug. Dev. Res.* **38**, 67–71.
- [10] Colman R. W. (1990), *FASEB J.*, **4**, 1425–1435.
- [11] Cristalli G., Mills D. C. (1993), *Biochem. J.*, **291**, 875–881.
- [12] Drury A. N., Szent-Gyorgi A. (1929), *J. Physiol.*, **68**, 213–237.
- [13] Dubyac G. R., El-Moatassim C. (1993), *Am. J. Physiol.*, **265**, C577–C606.
- [14] Gaardner A., Jonsen J., Laland S., Hellem A., Owren P. A. (1961), *Nature*, **192**, 531–532.
- [15] Gachet C., Hechler B., Leon C., Vial C., Ohlmann P., Cazanave J. P. (1996), *Platelets*, **7**, 261–267.
- [16] Gachet C., Hechler B., Leon C., Vial C., Leray C., Ohlmann P., Cazanave J. P. (1997), *Thrombos. Haemostas.*, **78**, 271–275.
- [17] Gachet C., Payrastre B., Guinebault C., Trumel C., Ohlmann P., Maucoco G., Cazanave J. P., Plantavid M., Chap H. (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**, 4850–4854.
- [18] Harden T. K., Boyer J. L., Nicholas R. A. (1995), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 541–579.
- [19] Heermskerk J. W. M., Sage S. O. (1994), *Platelets*, **5**, 295–316.
- [20] Hellem A. J. (1960), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**, 1–117.

- [21] Holmsen H. (1981), *Vox. Sang.*, **40**, suppl. 1, 1-7.
- [22] Hourani S. M. O., Cusack N. J. (1991), *Pharmacol. Rev.*, **43**, 243-298.
- [23] Hourani S. M. O. (1996), *J. Autonomic. Pharmacol.*, **16**, 349-352.
- [24] Leon C., Hechler B., Vial C., Leray C., Cazanave J. P., Gachet C. (1997), *FEBS Letters*, **403**, 26-30.
- [25] Lustig K. D., Shiau A. K., Brake A. J., Julius D. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **90**, 5113-5117.
- [26] MacKenzie A. B., Mahaut-Smith M. P., Sage S. O. (1996), *J. Biol. Chem.*, **271**, 2879-2881.
- [27] Michal F., Born G. V. R. (1971), *Nature*, **231**, 220-222.
- [28] Miras-Portugal M., Castro E., Mateo J., Pintor J. (1996), [w:] *P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms*, Wiley, Chichester, 35-52.
- [29] Mills D. C. B., Smith J. B. (1972), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **201**, 391-399.
- [30] Mills D. C. B. (1996), *Thrombos. Haemostas.* **76**, 835-856.
- [31] Nachman R. L., Ferris B. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 704-710.
- [32] Ohlmann P., Laugwitz K. L., Spicher K., Niernberg K., Schulz G., Cazanave J. P., Gachet C. (1995), *Biochem. J.*, **312**, 775-779.
- [33] Sage S. O. (1997), *Experimental. Physiol.*, **82**, 807-823.
- [34] Savi P., Herbert J. M. (1996), *Med. Res. Rev.*, **16**, 159-179.
- [35] Savi P., Bornia J., Salel V., Delfaud M., Herbert J. M., (1997), *Brit. J. Haematol.*, **98**, 880-886.
- [36] Vial C., Hechler B., Leon C., Casenave J. P., Gachet C. (1997), *Thrombos. Haemostas.*, **78**, 1500-1504.
- [37] Wachowicz B. (1982), *Haemostasis*, **11**, 139-148.
- [38] Webb T. E., Simon J., Krishek B. J., Bateson A. N., Smart T. G., King B. F., Burnstock G., Barnard E. A. (1993), *FEBS Letters*, **324**, 219-225.
- [39] Zimmermann H. (1992), *Biochem. J.*, **285**, 345-365

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki

Barbara Wachowicz

PURINOCEPTORS ON BLOOD PLATELETS

This review presents the current nomenclature and classification of purinoceptors. Extracellular adenine nucleotides interact with P_2 receptors to regulate a broad range of physiological processes. Five types of P_2 receptors were originally described: P_{2X} , P_{2Y} , P_{2T} , P_{2U} and P_{2Z} . P_{2T} receptors expressed on blood platelet membranes are responsible for the complex process of ADP-induced platelet activation. The cloning of P_2 receptors led to a reorganisation of the nomenclature of purinoceptors. ADP plays a major role in platelet activation and more than one purinoceptor appears to be involved in multiple effect of ADP on platelets. Blood platelets express both P_{2Y1} receptors (metabotropic) coupled with G protein, responsible for inhibition of adenylate cyclase and platelet aggregation and P_{2X1} receptors (ionotropic) responsible for Ca^{2+} influx.