



LS 133

H 3142

MAREK W. RADOMSKI

ŚRÓDBŁONKOWY CZYNNIK ROZSZERZAJĄCY
JAKO REGULATOR PROCESU AKTYWACJI PŁYTEK KRWI.
INTERAKCJA Z PROSTACYKLINĄ

ROZPRAWA HABILITACYJNA

PRACOWNIA FIZJOLOGII KRAŻENIA
INSTYTUTU CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

WARSZAWA, 1990

Motto:

' No doubt the modern scientist knows more than Archimedes, and no doubt the modern novelist has a wider range of experience than Homer, and more precise tools to analyse human thoughts and emotions. But neither of them arrived at their present station by the shortest way, and though both of them solved many riddles and attained to important part-truths, neither of them is sure whether the present direction of his zig-zag course leads him towards a closer approximation. Nor is the scientist in a much better position to ascertain the correctness of his course. He, too, must ultimately rely on his intuitions, and the interpretation which he puts on his bundle of data will remain open to controversy...'

A. Koestler.

'The act of creation'

'Wy przyjaciele moi, gdziekolwiek jesteście
Czyli was gnębi troska, czy radość napełnia,
Do was podnoszę kubek z winem...'

Słowa mi Czesława Miłosza chciałbym podziękować Tym, którzy
przyczynili się do rozwoju mojej pracy i zainteresowań
naukowych. Nie sposób wymienić tu Wszystkich, lecz specjalne wyrazy
wdzięczności chciałbym skierować pod adresem: Pana Profesora R.

Gryglewskiego, który skierował moje kroki na drogę pracy
doświadczalnej; Kolegów i Przyjaciół z Wellcome Research
Laboratories w Beckenham w Anglii, a w szczególności pod
adresem Pana Doktora S. Moncady za lata wspólnych badań, fascynacji
i niesłabnącego poparcia oraz pod adresem Kolegów i Przyjaciół
z Katedry Farmakologii AM w podzięcie za długoletnią, koleżeńską
współpracę.

Mojej Żonie Ani i Córkom Basi i Oli dedykuję tę pracę.

STRESZCZENIE

1. Komórki śródbłonka w hodowli stymulowane przez bradykininę wydzielają prostacyclinę i śródbłonkowy czynnik rozszerzający (EDRF).
2. EDRF :
 - 2.1. hamuje adhezję płytek do kolagenu III, macierzy pozakomórkowej komórek śródbłonka oraz do komórek śródbłonka ;
 - 2.2. hamuje agregację płytek wywołaną przez różne czynniki agregacyjne ;
 - 2.3. pobudza rozpad agregatów płytkowych utworzonych w wyniku działania kolagenu III lub analogu tromboksanu A_2 - U46619.
3. Porównanie farmakologicznego profilu działania EDRF z egzogennym tlenkiem azotu (NO) na płytki krwi oraz obserwacja, że stymulowane komórki śródbłonka wydzielają NO w ilościach wystarczających dla wytłumaczenia przeciwplatekowego działania EDRF , wskazują, że struktura chemiczna EDRF jest tożsama z NO.
4. Podprogowe ilości NO i prostacycliny synergistycznie hamują proces agregacji i pobudzają dezagregację płytek krwi.
5. Przeciwplatekowe działanie NO jest również potęgowane przez selektywne inhibitory esterazy dwufosforanowej rozkładającej cGMP.
6. Hipotezy : fizjologiczna, biochemiczna i farmakologiczna:
 - 6.1. hamowanie procesu aktywacji płytek krwi odbywa się na drodze synergistycznego współdziałania podprogowych ilości mediatorów uwalnianych przez układ śródbłonek-płytki krwi ;
 - 6.2. aktywacja cykazy guanylowej i podwyższenie cGMP hamuje proces adhezji i agregacji i pobudza dezagregację płytek ;
 - 6.3. łączne stosowanie podprogowych ilości agonistów cykazy guanylowej i adenylowej z selektywnymi inhibitorami esteraż dwufosforanowych może stanowić projekt nowej strategii dla zwiększania skuteczności i obniżania toksyczności leczenia przeciwplatekowego.

Następujące publikacje stanowiły podstawę do napisania niniejszej pracy:

1. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *British Journal of Pharmacology* 92, 181-187, 1987.
2. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* 92, 639-647, 1987.
3. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* ii, 1057-1058, 1987.
4. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148, 1482-1489, 1987.
5. Radomski MW, Esplugues JV. Regulatory properties of vascular endothelium. Focus on prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*. 10(8), 537-541, 1988.
6. Radomski MW, Palmer RMJ, Read NG, Moncada S. Isolation and washing of human platelets with nitric oxide. *Thrombosis Research* 50, 537-546, 1988.
7. Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing

factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical Pharmacology* 37, 2495-2501, 1988.

8. Radomski MW. Śródbłonek naczyń krwionośnych w procesach hemostazy i zakrzepicy. Rola prostacykliny i EDRF. *Acta Physiologica Polonica*, w druku.

WPROWADZENIE

Aktywacja płytek krwi jest integralną częścią hemostazy naczyniowej. Hemostazę można podzielić na pięć zachodzących wzajemnie na siebie etapów (1). Są nimi: lokalny skurcz naczyń, adhezja płytek, agregacja płytek, powstawanie sieci włóknika i proces naprawczy uszkodzonego naczynia. Zakres niniejszej pracy obejmuje charakterystykę fizjologicznej regulacji etapów adhezji i agregacji płytek krwi.

1. Przebieg adhezji i agregacji.

Nieuszkodzony śródbłonek naczyń nie ma żadnych własności zakrzepotwórczych (2). W momencie przerwania ciągłości śródbłonka, strumieniowi krwi ukazują się struktury podśródbłonkowe. W strumieniu krwi płytki zajmują pozycję najbliższą ścianie naczynia, łatwo dochodzi więc do adhezji (przywierania) płytek do struktur podśródbłonkowych. Badania morfologiczne wskazują, że adhezja składa się z dwóch faz: początkowego kontaktu pojedynczych płytek (faza C) oraz z fazy S t.j. rozpościerania się płytek na

śródbłonku (3). Faza S zwiastuje etap agregacji płytek. Jak wskazują badania w mikroskopie elektronowym (4) agregacja rozpoczyna się zmianą fizjologicznie dyskoidalnego kształtu płytki na kulisty z licznymi kolczystymi wypustkami cytoplazmatycznymi. Ziarenka płytkowe tworzą wtedy zbity konglomerat oraz dochodzi do powstania luźnych połączeń pomiędzy sąsiadującymi płytkami na drodze kontaktu ich wypustek. Jest to tzw. pierwsza faza agregacji płytek. Faza druga zaczyna się od pobudzenia aparatu kurczliwego płytek (skurcz wewnętrzny) i opróżnienia zawartości ziarenek drogą układu kanalików na zewnątrz (reakcja uwalniania), a kończy się powstawaniem trwałych połączeń pomiędzy płytkami (4,5,6).

2. Mechanizmy regulujące adhezję i agregację.

2.1. Czynniki zwiększające adhezję i agregację.

2.1.1. Siły tnące i krwinki czerwone.

Ze względu na niewielkie rozmiary (2 μm) i mały ciężar płytek oraz na to, że w płynącej krwi jej elementy morfotyczne mają układ laminarny, powstają między nimi siły (ścierania, tnące), których wypadkowa utrzymuje płytki w bezpośrednim kontakcie ze śródbłonkiem (7). Działanie sił tnących jest tym większe im mniejszy jest kaliber naczynia (8) i wzrasta wprost proporcjonalnie do ilości krwinek czerwonych w osoczu (9).

2.1.2. Produkty aktywacji krwinek białych.

W czasie spełniania fizjologicznej funkcji obronnej krwinki białe ulegają aktywacji. Aktywacja ta związana jest m.in. z adhezją

komórek do śródbłonna i produkcją biologicznie czynnych substancji, które potęgują agregację płytek (nadtlenek wodoru i peptydo-leukotrieny) jak i hamują śródbłonkową biosyntezę prostacykliny (nadtlenki lipidów) (10-13). Interakcja płytek z leukocytami, może dalej rozwijać się wg zasady circulus vitiosus, gdyż pobudzone płytki produkują substancje, które zwiększają adhezję leukocytów do śródbłonna (serotonina, ADP i nadtlenki lipidów) (14).

2.1.3. Białka i peptydy : kolagen, czynnik VIII/von Willebranda, fibrynogen, trombina i wazopresyna.

2.1.3.1. Kolagen

Jest on najważniejszym składnikiem tkanki łącznej podśródbłonkowej. W ścianie naczynia krwionośnego u człowieka spotyka się zazwyczaj następujące typy kolagenu: I, III, IV i V. W czasie interakcji płytek z kolagenem V dochodzi jedynie do fazy C adhezji. Fazy C i S adhezji mają miejsce w obecności kolagenu IV, natomiast do adhezji i agregacji dochodzi poprzez działanie kolagenów I i III (15-19). Podstawy interakcji kolagenu z płytkami zostały niedawno poznane. Już wcześniej wskazywano na to, że płytki wywołują retrakcję sieci kolagenowej in vitro (20). Analiza ultracienkich skrawków uzyskanych w czasie

agregacji płytek kolagenem wykazała, że jego włókienka oplatają cytoplazmatyczne wypustki płytek na kształt macek. Pomiędzy kolagenową macką a powierzchnią błony komórkowej znajdują się gęste dla elektronów mostki o dł ok. 7 nm, reprezentujące prawdopodobnie receptorowe glikoproteidy płytki (21).

2.1.3.2. Czynniki VIII/von Willebrand (VIII/vWF) i glikoproteidy płytkowe.

Czynnik von Willebranda jest białkiem syntetyzowanym przez komórki śródbłonna znajdującym w ścianie naczynia, osoczu i w ziarenkach płytkowych (22-24). U chorych z chorobą von Willebranda, brak tego czynnika upośledza agregację płytek wywołaną ristocetyną, która zwiększa wiązanie VIII/vWF do płytek (25). W tym wiązaniu biorą udział płytkowe glikoproteidy Ib, IIB i IIIa. W fazie C adhezji wiązanie to odbywa się za pośrednictwem glikoproteidu Ib, natomiast w fazie S wiązanie VIII/vWF odbywa się poprzez kompleks glikoproteidów IIB/IIIa (26,27). W czasie agregacji wywołanej przez ADP lub trombinę wiązanie VIII/vWF do kompleksu IIB/IIIa jest kompetycyjnie hamowane przez fibrynogen (28). Fakt ten przemawiałby przeciwko fizjologicznemu znaczeniu VIII/vWF w agregacji, rezerwując dla tego czynnika rolę proadhezyjnej kotwicy doczepiającej płytki do śródbłonna (29).

2.1.3.3. Fibrynogen.

Jest on białkiem syntetyzowanym przez wątrobę i zbudowanym z 3 heterogennych par łańcuchów polipeptydowych (30). W środowisku

naturalnym płytki fibrynogen znajduje się przede wszystkim w osoczu. Pewne ilości tego białka znajdują się w bezpośrednim związku z błoną komórkową jak i w ziarenkach typu α (30,31). Fizjologiczne znaczenie fibrynogenu w procesie agregacji polega na tym, że tworzy on mostki łączące płytki, co umożliwia powstawanie agregatów (29). Funkcję receptora fibrynogenu na płytce spełnia kompleks IIb/IIIa (29).

2.1.3.4. Trombina

Jest ona końcowym proteolitycznym enzymem w procesie koagulacji. Trombina powstaje w wyniku przecięcia glikoproteidu-protrombiny na dwie części i stanowi jej karboksylową połowę (32). W procesie aktywacji protrombiny ważną rolę odgrywa fosfatydyloseryna-fosfolipid budujący błonę komórkową płytki (33). Aktywność fosfatydyloseryny utożsamiana jest dzisiaj z historycznym czynnikiem płytkowym 3 (34). Trombina jest również potężnym stymulatorem adhezji, działając poprzez pobudzanie kompleksu receptorowego IIb/IIIa i ułatwianie wiązania VIII/VWF do płytki (26,27,29,35). Ponadto trombina aktywuje aparat kurczliwy komórek śródbłonka z następowym ich oddzieleniem od tkanki podśródbłonkowej i odkryciem włókien kolagenowych stymulujących adhezję (36).

Trombina jest jednym z najsilniejszych endogennych czynników wywołujących agregację. *In vitro*, ludzkie płytki agregują w obecności niezwykle małych ilości trombiny ($0.00012 \text{ U} * \text{ml}^{-1}$)

(37), natomiast w osoczu pobudzające działanie trombiny jest fizjologicznie hamowane przez antytrombinę III (38). Mechanizm proagregacyjnego działania trombiny nie jest do końca poznany, choć wiadomo, że może on częściowo polegać na pobudzaniu uwalniania ADP i tromboksanu A_2 z płytek (39).

2.1.3.5. Wazopresyna.

Peptyd ten jest hormonem o działaniu kurczącym naczyń krwionośnych i zapobiegającym diurezie. Wazopresyna wywołuje również agregację płytek krwi u człowieka poprzez stymulację swoistego receptora (V_1) z następową syntezą tromboksanu A_2 (40,41).

2.1.4. ADP, serotonina i adrenalina.

ADP jest jedną z substancji znajdujących w ziarenkach gęstych płytek (23). Spore ilości tego nukleotydu zawierają również krwinki czerwone. Born i koledzy uważają, że ADP odgrywa kluczową rolę w aktywacji płytek (42,43). Uszkodzenie naczyń zaburza bowiem laminarny przepływ krwi, co prowadzi do hemolizy erytrocytów. Uwolniony z nich ADP aktywuje kompleks IIB/IIIA, zapoczątkowuje wiązanie fibrynogenu z płytką, a w konsekwencji adhezję i pierwszą fazę agregacji (29). Jeśli ilość ADP w środowisku reakcji osiągnie wartość progową, dochodzi do uwolnienia wewnątrzpłytkowego ADP z ziarenek gęstych na zewnątrz płytki i przejścia agregacji odwracalnej w nieodwracalną. Ze względu na to, że substancje proagregacyjne n.p. kolagen, adrenalina czy kwas arachidonowy wykazują zdolność do

degranulacji ziarenek gęstych i uwalniania ADP uważa się, że nukleotyd ten wytycza jedną z dróg prowadzących do agregacji nieodwracalnej tzw. I drogę agregacji płytek (44).

Ziarenka gęste są jednym z najistotniejszych miejsc w ustroju gdzie przechowywana jest serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT) (45). Ludzkie płytki posiadają na swojej powierzchni receptor serotoninowy typu 5-HT₂ (46). W obecności egzogennej 5-HT dochodzi jedynie do odwracalnej agregacji (47), jednakże amina ta może potęgować proagregacyjne działanie tromboksanu A₂ i ADP oraz przyczyniać się do przejścia agregacji odwracalnej w nieodwracalną (patrz niżej).

Badania z zastosowaniem radioaktywnych ligandów wykazały, że płytka posiada na swojej powierzchni receptor adrenergiczny typu α_2 ,

który jest pobudzany przez katecholaminy, szczególnie przez adrenalinę (48,49). W warunkach fizjologicznych poziom tej katecholaminy w osoczu jest zbyt niski aby per se mógł pobudzać płytki, jednakże ból, strach i inne czynniki stresowe mogą zwiększać wydzielanie adrenaliny do ilości o działaniu proagregacyjnym (50).

2.1.5. Pochodne fosfolipidów błon komórkowych : PAF, eikozanoidy.

2.1.5.1. 1-alkilo-2(R)-acetylo-glicerolo-3-fosforylocholina

(AGEPC, Platelet Activating Factor, PAF).

Związek ten został po raz pierwszy opisany przez Benveniste i

kolegów jako czynnik uwalniany w czasie reakcji anafilaktycznej z bazofili królika, o działaniu pobudzającym agregację płytek (51). Jedną z najciekawszych cech PAF jest to, że powstaje on z i rozpada się do tego samego metabolitu/prekursora-lizoPAF. W leukocytach i płytkach cykl metaboliczny PAF rozpoczyna się od pobudzenia fosfolipazy A_2 (PLA_2) n.p. poprzez trombinę, która rozkłada alkilo-acylo-glicerolofosforylocholinę (Alkilo-Acylo-GPC) do 1-alkilo-2-lizo-glicerolofosforylocholiny (lizoPAF) z uwolnieniem kwasu tłuszczowego, którym najczęściej jest kwas arachidonowy (52-54). Acetylowanie biologicznie nieczynnego lizoPAF przez acetylotransferazę prowadzi do powstania biologicznie czynnego PAF. Rozkład PAF polega na hydrolitycznym odłączeniu octanu, ponownym utworzeniu lizoPAF, który następnie może służyć do biosyntezy Alkilo-Acylo-GPC (Ryc.1). PAF powstający poza płytką n.p. w toku aktywacji leukocytów wywołuje skurcz i oddzielanie się komórek śródbłonna od tkanki podśródbłonkowej, co zwiększa adhezję i agregację (55,56). Natomiast ilości PAF powstające w płytce w czasie reakcji uwalniania wywołanej innymi czynnikami agregującymi n.p. trombiną są prawdopodobnie zbyt małe, aby fosfolipid ten mógł być odpowiedzialny za wytyczanie III drogi prowadzącej do agregacji nieodwracalnej (57).

2.1.5.2. Eikozanoidy.

Eikozanoidy są to pochodne kwasu eikozatetraenowego

(arachidonowego), nienasyconego kwasu tłuszczowego, będącego składnikiem fosfolipidów błon komórkowych. Jedynie wolny, niezestryfikowany kwas arachidonowy (AA) może służyć jako substrat do biosyntezy eikozanoidów w płytce (58). Kwas arachidonowy jest przede wszystkim uwalniany z następujących fosfolipidów płytki: fosfatydylocholiny (PC) fosfatydyloetylenoaminy (PE) i fosfatydyloinozytolu (PI), ale do dziś pozostaje kwestią sporną, który z ww. fosfolipidów dostarcza najwięcej AA w czasie aktywacji płytek (59-62). Broekman uważa, że podczas agregacji płytek przez trombinę (15 U per 5*10⁶ płytek) z PC, PE i PI powstają porównywalne ilości AA (63). Nie budzi natomiast większych kontrowersji sposób w jaki dochodzi do uwolnienia AA w czasie aktywacji płytki: receptorowe stymulatory aktywacji płytek n.p. adrenalina lub trombina zwiększają aktywność fosfolipazy C (PLC), która kontroluje metabolizm swoistych frakcji PI do pochodnych o działaniu jonoforowym (podrozdział 2.1.7.). Endogenne jonofory zwiększają poziom $[Ca^{2+}]_i$, z następową aktywacją PLA_2 , która amplifikuje proces uwalniania AA zapoczątkowany przez PLC (64) (Ryc.2). Wolny AA w płytkach podlega działaniu dwóch kompleksów enzymatycznych: cyklooksygenazy i lipoksygenazy. Kompleks cyklooksygenazy katalizuje dwuetapową reakcję utleniania AA. W etapie pierwszym dochodzi do cyklizacji AA z jednoczasowym

wprowadzeniem cząsteczki tlenu-powstaje wtedy prostaglandyna G_2 (PGG_2). W etapie drugim na skutek peroksydacji PGG_2 powstaje prostaglandyna H_2 (PGH_2). Prostaglandyna H_2 stanowi centralny substrat dla powstawania w płytkach tromboksanu A_2 (TXA_2), 17 węglowego hydroksykwasu (HHT), aldehydu malonowego oraz tzw. klasycznych prostaglandyn (65-70) (Ryc.3).

Kompleks lipoksygenazy odpowiedzialny jest za liniowe utlenianie AA w pozycji C_{12} . Reakcja ta przebiega również dwuetapowo, prowadząc na początku do syntezy nadtlenku AA (12-HPETE) a następnie po jego redukcji do powstawania hydroksylowej pochodnej AA (12-HETE) (71,72) (Ryc.3).

Cykliczne nadtlenki: PGG_2 i PGH_2 oraz TXA_2 spełniają ważną rolę w adhezji i agregacji. Wykazano, że proadhezyjne działanie tych związków polega na pobudzaniu fazy S adhezji (73,74). Na potężne proagregacyjne własności TXA_2 wskazywały już pionierskie prace Samuelssona i kolegów i dzisiaj przyjmuje się, że związek ten wytycza II drogę prowadzącą do agregacji nieodwracalnej (44,75). Działanie cyklicznych nadtlenków i TXA_2 na płytki odbywa się poprzez pobudzenie swoistego receptora (TXA_2/PGH_2) wspólnego dla tych czynników (76,77).

Udział metabolitów 12-lipoksygenazy w aktywacji płytek pozostaje nadal niejasny, co prawdopodobnie wynika z braku selektywnego inhibitora tego enzymu (78-80).

2.1.6. Synergizm w aktywacji płytek. Rola trombiny, wazopresyny, adrenaliny i ADP.

Wyniki pomiaru poziomu ww. substancji w osoczu wykazują, że ilości ich są za niskie, aby każda z nich per se mogła pobudzić aktywację. Obserwacja ta nie podważa jednak potencjalnej roli tych czynników w adhezji i agregacji, stwierdzono bowiem istnienie zjawiska synergizmu w działaniu proaktywacyjnym ww. substancji (81,82). Zjawisko to polega na tym, że minimalne (podprogowe) ilości czynników, działając wspólnie, wykazują własności proagregacyjne. Badania in vitro wykazały, że czynnikiem o największym potencjale synergistycznym jest adrenalina, która potęguje działanie wszystkich znanych aktywatorów, pobudzając receptor α_2 -adrenergiczny (82).

2.1.7. Rola fosfolipazy C w procesie mobilizacji Ca^{2+} w płytce - cykl fosfatydyloinozytolowy.

W warunkach spoczynkowych, kiedy na płytkę nie działa żaden z czynników aktywujących, poziom $[Ca^{2+}]_i$ w cytoplazmie tej komórki jest niski ($r[Ca^{2+}]_i = 0.1 \mu M$) (83). Ponieważ w osoczu poziom Ca^{2+} jest przynajmniej 10000 razy większy niż w płytce, a nadmiernie duża ilość Ca^{2+} w cytoplazmie jest toksyczna, w płytce znajdują się mechanizmy ograniczające wzrost $[Ca^{2+}]_i$. Należą do nich: a. pompa Ca związana z ATP-azą błony komórkowej, b. błonowy system wymiany Na^+/Ca^{2+} , c. ATP-zależna pompa związana z systemem gęstych dla

elektronów kanalików i częściowo z otwartym systemem kanalików (84,85). W czasie aktywacji płytki dochodzi do znacznego podwyższenia $[Ca^{2+}]_i$ ($s[Ca^{2+}]_i = 10\mu M$). W cytoplazmie Ca^{2+} łączy się z kalmoduliną, a kompleks ten zapoczątkowuje ciąg zdarzeń metabolicznych wiodących do adhezji i agregacji (86) (Ryc.4). W jaki sposób sygnał niesiony przez aktywatory jest rozpoznawany przez płytkę i prowadzi do $s[Ca^{2+}]_i$? Odbywa się to na drodze syntezy w płytce biologicznie czynnych pochodnych fosfatydyloinozytolu (Ryc.5). Przyłączenie odpowiedniego agonisty do swoistego receptora n.p. adrenaliny do α_2 zapoczątkowuje proces łączenia się GTP z białkiem N_p . Kompleks GTP- N_p ma znaczenie regulacyjne dla PLC i jego powstanie aktywuje ten enzym. Fosfolipaza C hydrolizuje dwufosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_2) do trójfosforanu inozytolu (IP_3) i dwuacyloglicerolu (DG). Trójfosforan inozytolu spełnia rolę endogennego jonoforu tzn. mobilizuje Ca^{2+} z błonowych frakcji płytki do cytoplazmy. W płytce działanie endogennego jonoforu może mieć też kwas fosfatydowy (PA), który powstaje z DG. Dwuacyloglicerol aktywuje białkową kinazę C, enzym fosforylujący lekkie łańcuchy miozyny-białka zaangażowanego w procesy kurczliwe płytki (skurcz wewnętrzny). Trójfosforan inozytolu w łańcuchu kolejnych reakcji służy do resyntezy PI, zamykając krąg cyklu fosfatydyloinozytolowego (83) (Ryc.5).

2.2. Czynniki zmniejszające agregację.

2.2.1. Prostacyklina (prostaglandyna I_2 , PGI_2).

2.2.1.1. Biosynteza.

Prostanoid ten jest głównym metabolitem AA w śródbłonku dużych naczyń tętniczych i żylnych, natomiast w śródbłonku naczyń o mniejszym kalibrze obok PGI₂ powstaje również prostaglandyna E₂ (87,88). Do uwolnienia PGI₂ dochodzi w wyniku pobudzenia receptorów śródbłonka przez bradykininę, acetylocholinę, trombinę, interleukinę I i nukleotydy adeninowe (87,88). Czynność tych receptorów jest związana z pobudzeniem PLC, cyklu fosfatydyloinozytowego i mobilizacją Ca²⁺ z miejsc jego przechowywania w śródbłonku do cytoplazmy (89). Wzrost [Ca²⁺]_i aktywuje PLA₂, która hydrolizuje AA z fosfolipidów błon komórkowych tak, jak to opisano dla płytki krwi (Ryc.2). Etap receptorowy w powstawaniu PGI₂ może zostać pominięty w sytuacji stymulacji śródbłonka przez egzogeny jonofor n.p. A23187 lub przez substraty: AA lub PGH₂, które mogą zostać przekazane do śródbłonka w czasie jego interakcji z leukocytami i płytkami krwi (90). Biosynteza PGI₂ w śródbłonku znajduje się pod kontrolą dwóch enzymów: cyklooksygenazy i syntetazy prostacykliny (Ryc.3). Znaczący wpływ na aktywność tych enzymów wywierają nadtlenki lipidów. Niskie stężenia nadtlenków (10⁻⁷-10⁻¹⁰M) stymulują czynność cyklooksygenazy natomiast nadmiar tych substancji ma działanie hamujące (>10⁻⁶M) (88). Wykazano również, że czynność syntetazy prostacykliny jest hamowana w obecności nadtlenku kwasu arachidonowego- 15-HPETE (91,92).

2.2.1.2. Własności chemiczne.

Prostacyklina jest chemicznie nietrwała, gdyż w warunkach normalnego pH i temperatury, w roztworach wodnych szybko (1/2 t ok. 3 min) hydrolizuje do trwałej lecz pozbawionej działania biologicznego prostaglandyny 6-keto $F_{1\alpha}$ (93). Jest rzeczą ciekawą, że w przeciwieństwie do innych prostaglandyn PGI_2 nie podlega metabolizmowi w płucach (94), natomiast same płytki metabolizują ten prostanoid do dwóch trwałych metabolitów: prostaglandyny 6-keto E_1 (6-keto PGE_1) i trwałego metabolitu prostacykliny (SM- PGI_2), które podobnie jak substancja macierzysta mogą hamować proces aktywacji płytek krwi (95,96).

2.2.1.3. Własności biologiczne.

Prostacyklina jest jednym z najpotężniejszych inhibitorów agregacji, gdyż jej działanie występuje już w stężeniach nanomolarnych i dotyczy agregacji wywołanej wszystkimi znanymi aktywatorami (97). Prostanoid ten ma również działanie dezagregujące tzn. powoduje rozpad istniejących już agregatów płytkowych (98).

Prostacyklina rozszerza większość łożysk naczyniowych: wieńcowe, nerkowe, mięśni szkieletowych i płucne na drodze relaksacji naczyń opornościowych (99-101). Po konwersji do 6-keto PGE_1 i SM- PGI_2 , prostacyklina przyspiesza lizę skrzepu euglobulinowego (96,102,103). Wyższe (μM) stężenia PGI_2 wykazują działanie cytoprotekcyjne tzn. chronią komórki i tkanki przed uszkodzeniem wywołanym różnymi czynnikami uszkadzającymi. Dotyczy

to takich tkanek i komórek jak :śluzowka żołądka, m. sercowy i komórki wątrobowe (104-106). Zwrócono również uwagę na to, że zastosowanie PGI₂ w czasie izolacji płytek z krwi ludzkiej chroni je przed uszkodzeniem i zwalnia procesy starzenia w przechowywanej zawieszynie płytkowej (107-109). Do innych biologicznych własności PGI₂ można zaliczyć przyspieszenie metabolizmu estrów cholesterolu i hamowanie własności proliferacyjnych komórek mięśnia gładkiego naczyń krwionośnych (110,111).

2.2.1.4. Mechanizm działania układu cykazy adenyłowej w płytce.

Prostacyklina działa na płytkę za pośrednictwem swoistych receptorów związanych z układem cykazy adenyłowej (112-114). Układ cykazy adenyłowej składa się z części regulacyjnej i katalitycznej. Część regulacyjną budują dwa GTP-zależne białka łączące : białko N_s dla receptorów pobudzających n.p. dla receptora prostacykliny (I₂) oraz białko N_I dla receptorów hamujących n.p. dla receptora trombinowego (T) i adrenalinowego (α₂) (115,116). Część katalityczną układu stanowi cyklaza adenyłowa (AC), która z ATP wytwarza cAMP. Zgodnie z przedstawionym schematem PGI₂ podwyższa a trombina i adrenalina obniżają poziom cAMP (Ryc.6). Powstający cAMP pośredniczy w procesach prowadzących do obniżenia [Ca²⁺]_i. Wzrost cAMP stymuluje bowiem aktywność pompy wapniowej usuwającej Ca²⁺ z cytoplazmy do frakcji kanalików jak i hamuje działanie PLC i powstawanie endogennych jonoforów w

płytkce (117,118).

2.2.2. Kwas 13-hydroksyoktadienowy (13-HODE).

Związek ten został opisany po raz pierwszy przez Buchanana i kolegów jako produkt lipoksygenacji kwasu linolenowego w komórkach śródbłónka (119,120). Autorzy odkrycia uważają, że 13-HODE jest endogennym inhibitorem adhezji. Jest rzeczą ciekawą, że w obecności egzogenego 13-HODE adhezja płytek do śródbłónka przebiega normalnie. Świadczyć mogłoby to o tym, że związek ten nie jest uwalniany poza obręb śródbłónka i działanie 13-HODE dotyczy wyłącznie regulacji adhezyjnych własności tych komórek.

2.2.3. Śródbłonkowy czynnik rozszerzający, Endothelium-Derived Relaxing Factor, EDRF.

2.2.3.1. Odkrycie.

Związane jest ono z tzw. paradoksem acetylocholiny. Acetylocholina (ACh) zastosowana in vivo powoduje rozszerzenie naczyń, przejawiające się obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi. Naczyniorozszerzające działanie ACh często nie było obserwowane in vitro, kiedy obiektem działania tej aminy biogennej były krążki pochodzące z różnych naczyń krwionośnych. Furchgott i Zawadzki wykazali, że klucz do rozwiązania

paradoksu Ach tkwi w śródbłonku, który łatwo ulega uszkodzeniu w czasie przygotowywania krążka tętniczego do badania in vitro. Acetylocholina rozszerza bowiem naczynia tętnicze pośrednio, pobudzając w śródbłonku syntezę nieprostaglandynowej substancji, którą autorzy odkrycia nazwali EDRF (121).

2.2.3.2. Budowa chemiczna.

Wielka nietrwałość EDRF w środowisku tkankowym (3-50sek) utrudniała poznanie jego budowy chemicznej (122-124). Pierwsze badania sugerowały, że EDRF mógłby być produktem lipoksygenacji AA bądź metabolitem enzymów zależnych od cytochromu p450 (125). W 1986 roku Furchgott oraz Ignarro i wsp. wysunęli hipotezę, że EDRF jest tlenkiem azotu (NO) (126,127). Późniejsze badania dostarczyły przekonujących dowodów na poparcie tej hipotezy. Porównano farmakologiczny profil działania EDRF, uwolnionego z komórek śródbłonka w hodowli, z egzogennym NO na paski aorty królika ułożone w kaskadzie Vane'a (128,129). Zarówno EDRF jak i NO rozszerzały paski naczyniowe, a efekt ten ulegał zmniejszeniu w miarę przesuwania się tych mediatorów w dół kaskady (130). Związki usuwające anion nadtlenny (O_2^-) takie jak dysmutaza O_2^- (SOD) i cytochrom C potęgowały, natomiast związki generujące O_2^- hamowały naczyniorozszerzające działanie EDRF i NO. Działanie to było również hamowane przez hemoglobinę (Hb), błękit metylenowy i zależało od powstawania cGMP w ścianie naczynia (131-136). Stwierdzono również, że pobudzenie komórek

śródbłonka prowadzące do uwolnienia EDRF wiąże się z wydzielaniem mierzalnych ilości NO (130). Ilości te są wystarczające do wywołania działania naczyniorozszerzającego, które przypisuje się EDRF (tabela 1).

Tabela 1. Kryteria identyfikacji EDRF jako NO.

Własność	EDRF	NO
Pochodzenie śródbłonkowe	+	+
Rozszerzanie naczyń	+	+
Trwałość, 1/2 t, sek	3.6 ± 0.1	4.1 ± 0.2
Hamowanie przez Hb, związki generujące O ₂ i błękit metylenowy	+	+
Potęgowanie przez SOD i cytochrom C	+	+
Pobudzanie cyklazy guanylowej i wzrost cGMP	+	+

2.2.3.3. Biosynteza i losy w ustroju.

W ostatnim okresie uwaga badaczy zogniskowała się na problemie ustalenia źródła i mechanizmów biosyntezy NO. Wcześniejsze prace dotyczące sposobu uwalniania EDRF wskazywały na to, że do uwolnienia mediatora dochodzi w wyniku stymulacji śródbłonka przez Ach, trombinę, nukleotydy adeninowe, substancję P, wazopresynę, jonofor wapniowy A23187, bradykininę oraz różne nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe (137). Wskazywano również na znaczenie Ca²⁺ w procesie wydzielania EDRF (138, 139).

Zapotrzebowanie komórek śródbłonna na zewnątrzkomórkowy Ca^{2+} zmienia się w raz z miejscem ich anatomicznego pochodzenia i tak n.p. obniżenie poziomu Ca^{2+} w płynie perfuzyjnym hamuje wydzielanie EDRF ze śródbłonna tętnicy nerkowej, lecz nie ma wpływu na czynność wydzielniczą śródbłonna naczyń krezkowych (140). Ta ostatnia obserwacja wskazuje na znaczenie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w procesie wydzielania EDRF. Do wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dochodzi w wyniku pobudzenia PLC, biosyntezy endogennych jonoforów z następującą mobilizacją Ca^{2+} z błonowych frakcji śródbłonna do cytoplazmy (89, 141). W obecności Ca^{2+} i NADPH dochodzi prawdopodobnie do aktywacji enzymu, który utlenia grupę gwanidynową L-argininy do NO (142-149).

Jednym ze sposobów metabolizmu NO w ustroju jest jego utlenianie do azotynów i azotanów (150). Ostatnio Amezcua i koledzy wykazali, że równe ilości tych związków powstają z NO w czasie stymulacji obszaru naczyniowego izolowanego serca królika przy pomocy Ach (151).

2.2.3.4. Mechanizm działania.

Przyjmuje się, że naczyniorozszerzające działanie EDRF (NO) zależy od pobudzenia rozpuszczalnej podjednostki cyklicznej guanylowej i podwyższenia poziomu cGMP (152-154). Mechanizm działania cGMP polega prawdopodobnie na stymulacji pompy Ca^{2+} związanej z ATP-azą błony komórkowej i na przemieszczeniu Ca^{2+} poza obręb ściany naczynia (155).

3. Eksperymentalne przesłanki i cel pracy.

W drugiej połowie lat siedemdziesiątych opublikowano kilka prac wskazujących na to, że wzrost poziomu cGMP potęguje własności agregacyjne kolagenu, adrenaliny i AA oraz nasila reakcję uwalniania (156-159). Hipoteza o antagonistycznym działaniu cGMP względem cAMP (płytkowy wariant starochińskiej zasady jing-jiang) utrzymywała się aż do wczesnych lat osiemdziesiątych, kiedy to Mellion i koledzy zwrócili uwagę na to, że zahamowanie agregacji płytek przez organiczne pochodne azotu wiąże się z podwyższeniem poziomu cGMP (160). Fakt ten zachęcił Azumę i wsp. do próby zbadania działania EDRF na agregację. Badacze ci stwierdzili, że próbki perfuzatu naczyniowego pobranego w czasie stymulacji izolowanej aorty królika za pomocą Ach hamują agregację króliczych płytek, do której dochodzi w obecności AA (161). W oparciu o te badania wysunięto hipotezę, że antyagregacyjne działanie perfuzatu naczyniowego zależy od uwalniania EDRF (161). Azuma i koledzy nie byli jednak w stanie wykluczyć obecności w perfuzacie innych substancji o działaniu antyagregacyjnym (PGI_2 , ATP), które są uwalniane ze ściany naczynia przez Ach. Dynamiczny rozwój technik biologii komórkowej umożliwia dziś otrzymanie hodowli komórek śródbłonna osadzonych na plastikowych płytkach bądź na mikronośnikach (162, 163). Ostatnie badania wykazały, że komórki śródbłonna w hodowli mają zdolność do produkcji EDRF i PGI_2 (164, 165).

Celem niniejszej pracy było zbadanie roli EDRF i PGI_2 wydzielanych przez komórki śródbłonka w hodowli na adhezję i agregację płytek *in vitro*.

Cel ten postanowiono realizować przez rozwiązanie następujących problemów badawczych:

- a. zbadanie działania EDRF na adhezję i agregację
- b. odpowiedź na pytanie : czy wydzielanie NO ze śródbłonka jest odpowiedzialne za biologiczne działanie EDRF na płytki;
- c. zbadanie interakcji NO z PGI_2 w hamowaniu adhezji i agregacji oraz
- d. próba określenia znaczenia cGMP w tych procesach.

MATERIAŁY I METODY

1. Hodowla komórkowa.

1.1. Komórki śródbłonka (EC).

Komórki śródbłonka aorty uzyskiwano i hodowlę prowadzono zgodnie z zasadami uprzednio opublikowanej metody (128). Świeże fragmenty piersiowej części aorty świni lub wołowej uzyskiwane w czasie uboju zwierząt w rzeźni przechowywano na czas transportu w buforze fosforanowym (PBS) o pH 7.2, zawierającym w 1 ml 100U penicyliny i 100 μg streptomycyny. W laboratorium, zewnętrzną

powierzchnię aort przemywano 70% roztworem etanolu w wodzie, a następnie zewnętrzną powierzchnię aort i ich światło ostrożnie przepłukiwano PBS. Po usunięciu tkanki łącznej i tłuszczowej i podwiązaniu tętnic międzyżebrowych dolną część fragmentu aorty zamykano zaciskiem, a do wnętrza uzyskanego w ten sposób pojemnika dodawano roztworu kolagenazy (1 mg * ml⁻¹). Po 15 min inkubacji w temp. 37 C roztwór kolagenazy z zawieszonymi w nim EC wirowano (180 * g, 10 min, temp. pokojowa) i po usunięciu nadsączu EC zawieszano w medium (modyfikacja płynu Eagle'a wg Dulbecco, zawierająca 10-20% płodowej surowicy cielęcej i ww. mieszaninę antybiotyków). Po ponownym wirowaniu w tych samych warunkach EC pochodzące z każdej aorty oddzielnie zawieszano w medium i inkubowano (12h, 37 C) w pojemnikach hodowlanych (Corning, pow. 25 cm²) w celu uzyskania pierwotnej adhezji EC do podłoża. Następnie niezwiązane z podłożem EC usuwano przez delikatne przepłukanie hodowli w medium i inkubację kontynuowano przez ok. 24h do momentu uzyskania fazy rozprzestrzenienia się EC na podłożu. Komórki w tej fazie oddzielano od podłoża, stosując 0.125% roztwór trypsyny w EDTA, przemywano dwukrotnie w medium i osadzano na kuleczkach mikronośnika (Cytodex 3) lub na płytkach hodowlanych (Falcon, 24 miejsca hodowlane), na których prowadzono hodowlę wołowych EC. Komórki na mikronośnikach, po 8 cyklach (każdy cykl składał się z 5 min mieszania z szybkością 40 r.p.m. i 30 min spoczynku) inkubowano w 500 ml medium (37 C) i

mieszano w sposób ciągły z szybkością 40 r.p.m. Po 3-4 dniach EC całkowicie opłaszczają kuleczki mikronośnika, co potwierdzano w mikroskopie kontrastowo-fazowym. Komórki śródbłonna hodowane na płytkach całkowicie pokrywały miejsca hodowlane po 4-7 dniach, co odpowiadało liczbie pasaży 2-5.

Liczbę EC określano w hemocytometrze (166).

1.2. Macierz pozakomórkowa komórek śródbłonna (ECM).

Macierz pozakomórkową uzyskiwano poprzez lizę EC przy pomocy roztworu środka powierzchniowo czynnego (0.5% Triton X-100) inkubowanego przez 10 min w temp. 37 C w miejscach hodowli (1 ml w 1 miejscu). Następnie miejsca trzykrotnie przemywano (PBS, 37 C) i ECM przechowywano w temp. 4 C.

2. Izolacja płytek z krwi ludzkiej i ich znakowanie ¹¹¹In.

Do izolacji płytek stosowano metodę Radomskiego i Moncady (108), a uzyskaną zawiesinę znakowano używając zmodyfikowanej metody Sinzinger'a i kolegów (167). Obydwie metody opierają się na zastosowaniu PGI_2 w celu ochrony płytek przed aktywacją i zniszczeniem w czasie izolacji ich z krwi i znakowania ¹¹¹In. Krew (100-200ml), uzyskiwaną od zdrowych ochotników, pobierano do pojemników (Corning, 50ml) zawierających cytrynian trójsodowy i PGI_2 o końcowym stężeniu odpowiednio 0.32% i $6\mu\text{M}$. Osocze bogatopłytkowe (PRP) uzyskiwano w wyniku wirowania krwi (240 * g, 20 min, temp. pokojowa). Osocze bogatopłytkowe delikatnie oddzielano od erytrocytów, umieszczano w pojemnikach (Sterilin, 30

ml), dodawano PGI_2 ($1\mu\text{M}$) i wirowano ($900 \times \text{g}$, 10min , temp. pokojowa). Po odrzuceniu osocza ubogopłytkowego (PPP) peletkę płytkową przemywano dwukrotnie płynem Tyrod'a (37°C , w obecności PGI_2 $1\mu\text{M}$), a następnie płytki zawieszano w płynie Tyrod'a pozbawionym PGI_2 . Otrzymany preparat określano jako zawiesinę mytych płytek (WP).

W doświadczeniach z radioaktywnością po odrzuceniu PPP peletkę płytek zawieszano w 10ml płynu Tyrod'a z dodatkiem PGI_2 ($6\mu\text{M}$). Zawiesinę płytek inkubowano (30min , temp. pokojowa) w obecności oksynu indu (^{111}In , $50\mu\text{Ci}$). Po inkubacji $83 \pm 3\%$, $n=12$ radioaktywności znajdowano w płytkach. Pozostałość oddzielano przez wirowanie zawiesiny płytek ($700 \times \text{g}$, 10min , temp. pokojowa, w obecności PGI_2 $6\mu\text{M}$), nadsącz odrzucano, a płytki zawieszano w płynie Tyrod'a pozbawionym PGI_2 . Swoista aktywność płytek znakowanych indem wynosiła $4.18 \pm 0.19 \times 10^6 \text{c.p.m.}$, na 10^8 płytek $n=8$, a ilość radioaktywności niezwiązanej z płytkami była zawsze mniejsza niż 100c.p.m. Preparat ten określano jako zawiesinę znakowanych mytych płytek (LWP).

3. Odczynniki

Tlenek azotu (NO) o czystości większej niż 99.89% uzyskiwano z British Oxygen Corporation. Roztwory NO (0.03 – 3.00%) przygotowywano w odgazowanej helem, podwójnie destylowanej i dejonizowanej wodzie (130). W doświadczeniach stosowano 2 – $30\mu\text{l}$ próbki roztworu NO .

Następujące odczynniki zakupiono w firmie Sigma :
ADP, bradykinina, dysmutaza O_2^- , katalaza, indometacyna, aspiryna i typ
II kolagenazy.

Z firm wskazanych w nawiasach pochodzą następujące odczynniki : sól
sodowa prostacykliny i roztwór trypsyny w EDTA (Wellcome), medium
hodowlane, penicylina i streptomycyna (Gibco), surowica cieleca
(Flo w Labs), cytodex 3 (Pharmacia), ludzka trombina (Ortho
Diagnostics Inc), jonofor wapniowy A23187 (Calbiochem), analog
cyklicznych nadtlenków U46619 (Cayman), kolagen III (Hormon Chemie)
inhibitory esteraz dwufosforanowych : IBMX (Aldrich Co), MY5445
(Mitsubishi), MB22948 (May&Baker) i HL725 (Hoechst). Roztwór
ludzkiej hemoglobiny i methemoglobiny przygotowywano zgodnie z
metodą opisaną przez Patersona i wsp. (168).

Oksyn indu (^{111}In) i 3H - prostaglandyna $F_{1\alpha}$ zostały zakupione w
firmie Amersham.

4. Badanie adhezji.

4.1. Adhezja płytek do kolagenu III.

Stosowano metodę opisaną przez Manta (169) z modyfikacjami
Lapetiny i wsp. (170). Próbki płytek (duplikaty), zawierające 1.5×10^6
płytek w 0.5ml zawiesiny preinkubowano w dwukanałowym
agregometrze (Payton), w temp. 37°C i mieszano z szybkością 900
r.p.m., w obecności EDTA (5mM) dla zapobieżenia agregacji. Po 5
min dodawano kolagenu III ($50 \mu g \cdot ml^{-1}$) i inkubację prowadzono
przez następne 10min. Tlenek azotu i PGI_2 inkubowano przez 1 min a

inhibitory esteraz dwufosforanowych przez 2 min przed dodaniem kolagenu III. Jako wskaźnik adhezji płytek do kolagenu III przyjmowano różnicę w ilości wolnych płytek przed i po dodaniu kolagenu. Pomiar ilości wolnych płytek w zawiesinie dokonywany był elektronicznie aparatem Coulter Counter ZF (Coulter Electronics Ltd.).

4.2. Adhezja płytek do EC i ECM.

Komórki śródbłonna lub ich macierz przemywano dwukrotnie płynem Tyrod'a (37°C, 1ml na 1 miejsce). Próbki: aspiryny, hemoglobiny, methemoglobiny, dysmutazy O_2^- , MB22948, MY5445 i HL725 wszystkie w objętości 100 μ l inkubowano przez 15 min a NO , PGI_2 i bradykininę przez 1 min przed ostrożnym nawarstwieniem 1ml LWP (5 * 10⁶ płytek na 1 miejsce). Równocześnie z LWP dodawano trombinę (0.1-30 mU * ml⁻¹) i inkubację prowadzono przez 10 min w temp. 37°C. Po tym LWP niezwiązane z podłożem delikatnie usuwano a EC lub ECM przemywano płynem Tyrod'a j.w. Część radioaktywności, która pozostawała na miejscach inkubacyjnych była spowodowana adhezją płytek do EC lub ECM. Płytki te homogenizowano przez dodanie 0.5% roztworu Tritonu X-100 (1ml na 1 miejsce, 10 min inkubacji w temp. 37°C) a uwolnioną radioaktywność liczone w liczniku promieniowania γ (British Nuclear).

5. Badanie agregacji.

Agregację płytek mierzono w agregometrze świetlnym (Payton)

wg zasad opisanych przez Borna i Crossa (171).

5.1. Hamowanie agregacji.

5.1.1. Egzogenne NO i PGI₂.

Tlenek azotu, prostacyklinę oraz inne substancje modulujące działanie NO i/lub PGI₂ inkubowano z płytkami przez 15sek do 7min przed dodaniem czynnika agregacyjnego. Do agregacji używano : ADP (10μM), kolagenu III (1 lub 4 μg * ml⁻¹), trombiny (30mU * ml⁻¹), U46619 (1nM) i A23187 (10nM), które wywoływały maksymalną odpowiedź agregacyjną. Po dodaniu czynnika agregację monitorowano przez 3 min.

5.1.2. EDRF.

Do wytwarzania EDRF używano EC hodowanych na mikronośnikach (0.3-5.0 * 10⁷ komórek obecnych w 0.5-1.5ml mikronośników). Preparat ten przemywano trzykrotnie płynem Tyrod'a z indometacyną (37°C, 10uM) a następnie zawieszano w 0.5-1.5ml płynu o tym samym składzie do końcowej objętości 2ml. Uzyskaną zawiesinę EC przechowywano w temp. 37°C do momentu rozpoczęcia inkubacji. Próbki EC inkubowano w obecności bradykininy (Bk, 10-100nM), w temp. 37°C. Po 15sek część inkubatu (0.5ml) pobierano strzykawką i filtrowano (Milipore, 0.22μm) celem uzyskania 100μl przesącza, który dodawano do zawiesiny płytek (0.5ml) w agregometrze. Czas pobierania i filtrowania inkubatu był zawsze krótszy od 5sek. Po 1 min agregację wywoływano U46619 (1nM) lub kolagenem III (4μg * ml⁻¹) i monitorowano przez 5min.

5.1.3. Interakcja EDRF z endogenną PGI₂.

Zawiesinę EC w płynie Tyrod'a ($0.3-5.0 \times 10^7$) przygotowano jak w 5.1.2. i inkubowano z Bk (1-100nM). W części doświadczeń indometacyna (10 μ M) lub hemoglobina (100nM, Hb) były dodawane na 1min przed Bk. Antyagregacyjną aktywność inkubatu badano jak w

5.2. Pobudzanie dezagregacji.

Agregację płytek wywoływano przy pomocy kolagenu III (1 μ g * ml⁻¹) lub U46619 (1nM). Po 3 min (co odpowiadało $82 \pm 3\%$, n=6 maksymalnej odpowiedzi agregacyjnej) do agregujących płytek dodawano EDRF (przygotowanego jak w 5.1.2.), PGI₂ i/lub NO i agregację monitorowano przez 5min.

5.3. Ocena stopnia zahamowania agregacji i pobudzania dezagregacji.

Antyagregacyjną aktywność EDRF, NO i PGI₂ wyrażano w % hamowania, przyjmując jako 100% całkowite zahamowanie agregacji (0% transmisji światła).

Dezagregacyjną aktywność EDRF, NO i PGI₂ wyrażano w % pobudzania dezagregacji, przyjmując jako 100% całkowite odwrócenie agregacji (0% transmisji światła).

6. Oznaczanie EDRF, NO i PGI₂ w inkubatach EC.

Obecność EDRF w inkubatach EC potwierdzano biologicznie (128)

i farmakologicznie wg zasad przedstawionych w tabeli 1. Na 38 hodowli EC w 2 przypadkach stwierdzono brak biologicznej aktywności EDRF i komórki te odsunięto od badań płytkowych.

Tlenek azotu oznaczano metodą chemiluminescencyjną, natomiast metody radioimmunologicznej używano do oznaczania trwałego metabolitu PGI_2 -prostaglandyny 6-keto $\text{F}_{1\alpha}$ (130,172).

7. Statystyczne opracowanie wyników.

Wyniki przedstawiano jako $m \pm \text{s.e.m.}$ obliczone na podstawie n oddzielnych doświadczeń. Wielkości porównywano, używając testu t Studenta dla zmiennych niepowiązanych i przyjmując wartość $p < 0.05$ jako statystycznie znamiennej. Do obliczenia wartości IC_{50} używano metody analizy regresji liniowej.

WYNIKI

1. Adhezja płytek do kolagenu III.

1.1. Hamowanie adhezji przez NO i PGI_2 .

W czasie inkubacji adhezji ulegało $30.1 \pm 1.9\%$ płytek. Tlenek azotu i PGI_2 (0.1-10 μM), w sposób zależny od zastosowanego stężenia, spowodowały zahamowanie adhezji. W stężeniu 10 μM NO całkowicie zahamował adhezję, natomiast działanie PGI_2 było częściowe (Ryc.7).

1.2. Interakcja NO z PGI_2 .

W zakresie niskich stężeń (0.1-1 μM) obserwowano zjawisko

addycji w antyadhezyjnym działaniu NO i PGI₂, które nie występowało w stężeniu 3μM, a w stężeniu 10μM PGI₂ zahamowała antyadhezyjne działanie NO (Ryc.7).

1.3.Modulacja antyadhezyjnego działania NO i PGI₂.

W obecności hemoglobiny (0.1-3.0μM ,Hb) dochodziło do zmniejszenia antyadhezyjnego działania NO (3μM).Ilości Hb potrzebne do zmniejszenia o 50% tego działania (IC₅₀) były :1.2 ± 0.1μM,n=6.Hemoglobina (10μM,n=3) nie wpłynęła na antyadhezyjne działanie PGI₂.Methemoglobina (<10μM,n=3) nie wpłynęła na antyadhezyjne działanie NO i PGI₂.

Selektywne inhibitory esterazy dwufosforanowej rozkładającej cGMP

MB22948 (1μM) i MYS445 (0.6μM) spotęgowały antyadhezyjne działanie NO i PGI₂ (Ryc.8).Selektywny inhibitor esterazy dwufosforanowej rozkładającej cAMP HL725 (1fM) nie modulował antyadhezyjnego działania tych inhibitorów (Ryc.8).Żaden z tych 3 związków (we wskazanych stężeniach) nie zahamował per se adhezji płytek do kolagenu III (n=8)

2.Adhezja płytek do ECM i EC.

2.1.Hamowanie adhezji płytek do ECM przez egzogeny NO.

W warunkach podstawowych adhezja płytek do ECM wynosiła :11.4 ± 0.6%,n=6.W obecności trombiny (0.1-30mU * ml⁻¹) obserwowano zależny od stężenia wzrost adhezji do wartości maksymalnej :29.6 ± 1.0%,n=6.Tlenek azotu (10μM) zahamował adhezję płytek do ECM stymulowaną trombiną (3mU * ml⁻¹) (Ryc.9b).To hamujące

działanie NO było potęgowane przez dysmutazę O_2^- ($20U * ml^{-1}$, SOD) i MB22948 ($1\mu M$) a zmniejszane przez Hb ($1\mu M$). Bradykinina ($100nM$), Hb, SOD i MB22948 per se nie zahamowały adhezji płytek do ECM (Ryc. 9b).

2.2. Hamowanie adhezji płytek do EC przez egzogenne NO.

W warunkach podstawowych adhezja płytek do EC była niższa niż do ECM : $0.68 \pm 0.03\%$, $n=10$. W obecności trombiny ($0.1-30mU * ml^{-1}$) obserwowano zależny od stężenia wzrost ilości płytek ulegających adhezji do maksimum $9.2 \pm 0.5\%$, $n=10$. Dodanie egzogenne NO ($0.1-10\mu M$) spowodowało zahamowanie stymulowanej trombiną ($3mU * ml^{-1}$) adhezji płytek do EC maksymalnie do $44.6 \pm 2.7\%$, $n=5$.

2.3. Hamowanie adhezji płytek do EC przez EDRF.

Bradykinina ($100nM$) wydzielala EDRF, który znamienne zahamował adhezję płytek do EC wywołaną przez trombinę ($3mU * ml^{-1}$) (Ryc. 9a). Działanie EDRF było w sposób znamieny : potęgowane przez SOD ($20U * ml^{-1}$) lub MB22948 ($1\mu M$), zmniejszane przez Hb ($1\mu M$) oraz nie było modyfikowane przez aspirynę ($100\mu M$) (Ryc. 9a) lub methemoglobinę ($1\mu M$, $n=3$). Kiedy EC inkubowano bez Bk adhezja płytek była w sposób znamieny hamowana przez MB22948 (Ryc. 9a).

2.4. Uwalnianie NO i PGI_2 z EC.

W warunkach podstawowych EC uwalniały niewielkie ilości NO : $0.26 \pm 0.02\mu M$, $n=3$. Bradykinina ($30-300nM$) w sposób zależny od stężenia pobudziła uwolnienie NO do ilości : $0.84 \pm 0.12\mu M$, $n=3$. W

obecności trombiny ($3\text{mU} * \text{ml}^{-1}$) dochodziło do dalszego wzrostu wydzielania NO do $1.34 \pm 0.22\mu\text{M}, n=3$ (Ryc.10). Aspiryna ($100\mu\text{M}, n=3$) w sposób znamieny nie wpłynęła na wydzielanie NO.

W warunkach podstawowych EC nie wydzielały mierzalnych ilości PGI_2 ($6\text{-keto PGF}_{1\alpha} < 0.03\text{nM}, n=3$). Ilości PGI_2 ulegały zwiększeniu w obecności Bk ($30\text{-}300\text{nM}$) maksymalnie do $53.2 \pm 6.8\text{nM}, n=3$. W obecności aspiryny ($100\mu\text{M}, n=3$) stymulowane EC nie wydzielały mierzalnych ilości PGI_2 ($n=3$).

3. Antyagregacyjne własności EC

3.1. Działanie EDRF

3.1.1. EDRF jako inhibitor agregacji płytek.

Komórki śródbłonna ($2\text{-}5 * 10^7$ komórek zawartych w 1.5ml mikronośników) stymulowane przez Bk (100nM), w obecności indometacyny ($10\mu\text{M}$), wytworzyły EDRF. EDRF, zawarty w $100\mu\text{l}$ inkubatu komórek śródbłonna, zahamował agregację płytek wywołaną przez U46619 (1nM) (Ryc.11) lub kolagen ($4\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$) (Ryc.12a,b). Antyagregacyjne działanie EDRF zależało od ilości pobudzanych EC jak i od stężenia Bk (Ryc.12b). Przy stałej ilości EC (1.5ml), Bk w stężeniu 100nM wydzieliała ilości EDRF zdolne do całkowitego zahamowania agregacji (Ryc.12b), natomiast antyagregacyjna aktywność EDRF wydzielanego przez 30nM Bk była jedynie częściowa: $29 \pm 4\%$. Bradykinina (10nM) wydzieliała jedynie podprogowe ilości EDRF ($n=8$). Antyagregacyjne działanie EDRF występowało natychmiast ($< 3\text{sek}$) po dodaniu próbki inkubatu do zawiesiny płytek; 50% tej

aktywności zanikało po ok.2min ,a 100% po 4 min inkubacji (Ryc.13).

3.1.2.Zmniejszanie działania EDRF przez Hb i jony Fe^{2+} .

Antyagregacyjne działanie EDRF uwolnionego z 1.5ml EC przez Bk (100nM) było zmniejszane przez Hb (30-150nM) i $FeSO_4$ (1-20 μ M) (Ryc.11).Ilości Hb i $FeSO_4$ potrzebne do zmniejszenia o 50% antyagregacyjnego działania EDRF wytworzonego w tych warunkach były odpowiednio : $82 \pm 15nM$ i $8.5 \pm 3.0\mu M$,n=4.

3.1.3.Potęgowanie działania EDRF przez SOD i MB22948.

EDRF, uwolniony z 1ml EC przez Bk (100nM) ,który per se zahamował agregację w $45 \pm 6\%$,n=4,w obecności SOD (20U * ml^{-1}) lub MB22948 (1 μ M) zwiększył swoją aktywność do 100% (Ryc.14).Potęgujące działanie SOD było jeszcze lepiej widoczne w doświadczeniach,w których EDRF uwalniano z 0.5ml EC. W tych warunkach niehamujące agregację ilości EDRF,w obecności SOD spowodowały zahamowanie agregacji w $47 \pm 4\%$,n=4.Potęgujące działanie MB22948 było silniejsze od działania SOD,gdyż EDRF wydzielony przez Bk (100nM) z 0.5ml EC w obecności MB22948 wywołał całkowite zahamowanie agregacji (n=4).W obecności SOD i MB22948 dochodziło także do przedłużenia biologicznego $1/2 t$ EDRF (Ryc.13).

Antyagregacyjne działanie EDRF nie było modyfikowane przez katalazę (20U * ml^{-1}) lub HL725 (1fM) (n=3).

3.2. Działanie NO i PGI₂.

3.2.1. Hamowanie agregacji przez NO i PGI₂.

Egzogenny NO był skutecznym inhibitorem agregacji płytek wywołanej przez :ADP, kolagen, trombinę, U46619 lub A23187 (tabela 2).

Tabela 2. Porównanie antyagregacyjnej aktywności NO z PGI₂.

Agoniści	IC ₅₀ (n=10)	
	NO (μM)	PGI ₂ (nM)
ADP	0.30 ± 0.04	1.5 ± 0.4
Kolagen III	0.25 ± 0.03	2.1 ± 0.6
Trombina	0.32 ± 0.05	3.7 ± 1.2
U46619	0.24 ± 0.03	1.6 ± 0.4
A23187	1.08 ± 0.20	12.1 ± 5.4

Antyagregacyjne działanie NO było 100-200 razy słabsze od działania PGI₂ (tabela 2). Obydwa inhibitory były mniej aktywne w hamowaniu agregacji wywołanej przez jonofor wapniowy A23187. Biologiczny 1/2 t NO był zbliżony do biologicznego 1/2 t EDRF (Ryc. 13, 15). Biologiczny 1/2 t PGI₂ był 2-3 razy dłuższy niż 1/2 t EDRF lub NO i wynosił 4-5 min (n=6). Azotan (NO₃⁻) lub azotyn (NO₂⁻) sodowy w stężeniach <100 μM nie wpłynęły na agregację płytek (n=5).

3.2.2. Zmniejszanie działania NO przez Hb lub jony Fe²⁺.

Antyagregacyjne działanie NO (0.45 μM) było zmniejszane przez Hb (30-150 nM) lub FeSO₄ (1-20 μM). Ilości Hb i FeSO₄ potrzebne

do zmniejszenia o 50% antyagregacyjnego działania NO były odpowiednio: $76 \pm 11 \text{ nM}$, $n=6$ i $4.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$, $n=4$. Hemoglobina i FeSO_4 nie wpłynęły na antyagregacyjne działanie PGI_2 ($n=3$).

3.2.3. Potęgowanie działania NO przez SOD.

Antyagregacyjne działanie NO i jego biologiczny $1/2 t$ były potęgowane przez SOD ($20 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) (Ryc.15,16). Katalaza ($20 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) nie miała wpływu na antyagregacyjną aktywność NO i PGI_2 .

3.2.4. Modulacja hamującego działania NO i PGI_2 przez MB22948, IBMX i HL725.

Antyagregacyjne działanie :a. PGI_2 było potęgowane wybiórczo przez HL725 ($1 \mu\text{M}$). Związek ten potęgował również 2-3 razy $1/2 t$ PGI_2 ; b. NO było wybiórczo potęgowane przez MB22948 ($1 \mu\text{M}$); c. obydwu inhibitorów było potęgowane przez nieselektywny inhibitor estera dwufosforanowych IBMX ($5 \mu\text{M}$) (Ryc.17).

3.3. Synergizm antyagregacyjny NO z PGI_2 .

3.3.1. Wydzielnicze własności EC.

Stymulacja EC (1.5 ml) przy pomocy Bk ($1-100 \text{ nM}$) prowadziła do wydzielania PGI_2 i NO, które zahamowały agregację płytek wywołaną przez kolagen ($4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (tabela 3).

Tabela 3. Uwalnianie NO i PGI_2 ze śródbłonka a hamowanie agregacji*.

Bk (nM)	PGI_2 (nM)	n=3-6 NO (μM)	Hamowanie (%)
---------	---------------------	-------------------------------	---------------

100	18.5 ± 1.7	0.47 ± 0.05	100 ± 0
30	7.7 ± 1.0	0.16 ± 0.03	100 ± 0
10	2.3 ± 0.3	ND	100 ± 0
3	1.4 ± 0.2	ND	83 ± 5
1	ND	ND	38 ± 3

*Stężenia egzogennych NO i PGI₂ potrzebnych do zahamowania agregacji wywołanej przez kolagen (4μg * ml⁻¹) były odpowiednio: 0.12-0.45μM (IC₅₀=0.25 ± 0.03) i 0.3-6.0nM (IC₅₀=2.3 ± 0.3), n=10. ND-poniżej progu detekcji: PGI₂ <0.03nM ; NO <0.1μM.

Działanie NO i PGI₂ wydzielonych przez Bk (10nM) było zmniejszane przez indometacynę (10μM) lub Hb (100nM) (Ryc.18.1 ; 18.2).

3.3.2. Potęgowanie antyagregacyjnego działania EDRF, NO i PGI₂.

Antyagregacyjne działanie podprogowych ilości EDRF i egzogenego NO było potęgowane przez PGI₂ (Ryc.19, tabela 4).

Tabela 4. Potęgowanie antyagregacyjnego działania NO przez podprogowe ilości PGI₂ (0.1nM)*

Agonista	IC ₅₀ (μM, n=10)	
	NO	NO+PGI ₂
ADP	0.28 ± 0.04	0.07 ± 0.02
Kolagen	0.25 ± 0.03	0.06 ± 0.02
Trombina	0.31 ± 0.04	0.08 ± 0.03
U46619	0.34 ± 0.05	0.05 ± 0.01

*Wartości IC₅₀ w kolumnie NO były znamienne wyższe od odpowiadających im wartości w kolumnie NO+PGI₂. W obrębie każdej z

kolumn nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic.

Antyagregacyjne działanie PGI_2 było również potęgowane przez podprogowe ilości NO (tabela 5).

Tabela 5. Potęgowanie antyagregacyjnego działania PGI_2 przez podprogowe ilości NO ($0.1\mu\text{M}$)*

Agonista	IC_{50} (nM, n=10)	
	PGI_2	$\text{PGI}_2 + \text{NO}$
ADP	2.0 ± 0.5	0.6 ± 0.1
Kolagen	2.3 ± 0.4	0.8 ± 0.2
Trombina	3.7 ± 1.2	1.0 ± 0.2
U46619	2.4 ± 0.3	0.9 ± 0.3

*Wartości IC_{50} w kolumnie PGI_2 były znamienne wyższe od odpowiadających im wartości IC_{50} w kolumnie $\text{PGI}_2 + \text{NO}$. W obrębie żadnej z kolumn nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic.

4. Dezagregacyjne własności EC.

4.1. Działanie EDRF, NO i PGI_2 .

Egzogenny NO ($0.15-1.25\mu\text{M}$) powodował dezagregację płytek zagregowanych uprzednio przez kolagen III ($1\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$) (Ryc.20a) lub przez U46619 (1nM , n=6). Egzogenna PGI_2 ($0.1-6\text{nM}$) wywoływała silniejsze działanie dezagregacyjne (n=6). Stopień dezagregacji wywołanej maksymalnie skutecznymi stężeniami NO ($1.25\mu\text{M}$) lub PGI_2 (6nM) był zbliżony i wynosił odpowiednio 68 ± 1.8 lub $70.0 \pm 2.6\%$, n=6. Ilości NO lub PGI_2 potrzebne do dezagregacji płytek

uprzednio zagregowanych przez U46619 (1nM) nie różniły się w sposób znamieny od ilości potrzebnych do wywołania dezagregacji płytek zagregowanych kolagenem III (n=6). EDRF, wydzielony przez Bk (100nM) z EC (1.0 lub 1.5ml) wykazywał częściowe działanie dezagregacyjne odpowiednio: 21 ± 6 lub $43 \pm 10\%$ (Ryc.20b).

4.2. Potęgowanie dezagregacyjnego działania EDRF, NO i PGI₂.

Połączenie podprogowych stężeń NO (0.1 μ M) i PGI₂ (0.1nM) wywoływało maksymalny efekt dezagregacyjny (Ryc.21a). Efekt ten nie ulegał zwiększeniu nawet przez połączenie maksymalnie skutecznych ilości NO (1.25 μ M) i PGI₂ (6nM), n=5. Dezagregacyjne działanie podprogowych ilości NO i ilości EDRF wydzielanych przez Bk (100nM) z EC (0.5ml) było potęgowane w obecności SOD (20U * ml⁻¹) lub MB22948 (1 μ M) (Ryc.21b).

DYSKUSJA

1. Rola EDRF w hamowaniu aktywacji płytek.

1.1. Adhezja.

Proces adhezji płytek do śródbłonna oraz do innych składników tkanki łącznej podśródbłonkowej ma kluczowe znaczenie dla fizjologii i patologii układu krzepnięcia krwi. Pierwotny kontakt płytki ze ścianą naczynia krwionośnego poprzedza zarówno fizjologiczne zjawisko hemostazy jak i chorobową zakrzepicę, prowadzącą do nieodwracalnych zmian w ukrwieniu tkanek

i narządów dotkniętych tym procesem. W ciągu ostatnich lat zanotowano szereg osiągnięć związanych z poznaniem mechanizmów rządzących pobudzaniem adhezji płytek, z których najważniejsze opisano we Wprowadzeniu. Znacznie więcej kontrowersji wzbudzają czynniki odpowiedzialne za ograniczenie adhezji, które razem z czynnikami hamującymi agregację warunkują tzw. przeciwzakrzepowe własności śródbłonna. Termin ten został wprowadzony do literatury w latach siedemdziesiątych naszego stulecia (173,174), ale na szczególną rolę śródbłonna w zapobieganiu krzepnięciu krwi wskazywały już prace XIX-wiecznych badaczy hemostazy i zakrzepicy naczyniowej (175,176). Prace te traktowały śródbłonek w kategoriach mechanistycznych jako idealną, nieaktywującą dla elementów morfotycznych krwi barierę, która rozdziela krew od przestrzeni pozanaczyniowej. Badania ostatnich 10 lat zwróciły uwagę na to, że śródbłonek jest nie tylko jednostką morfologiczną ale i metaboliczną zdolną do syntezy i uwalniania substancji o dużym działaniu biologicznym i potencjalnych własnościach regulacyjnych dla hemostazy.

1.1.1. Prostacyklina nie jest endogennym inhibitorem adhezji.

Badania nad działaniem PGI_2 na adhezję płytek do elementów ściany naczyniowej dostarczyły szeregu kontrowersji. Już pionierska praca Higgs i wsp. wskazywała, że PGI_2 jest słabym inhibitorem adhezji płytek do tkanki podśródbłonkowej aorty królika *ex vivo* i jej działanie jest widoczne jedynie w stężeniach 100 razy

większych od stężeń hamujących agregację (> 0.3nM-działanie antyagregacyjne, >60nM-działanie antyadhezyjne) (177). Późniejsze prace sugerowały, że endogenna PGI₂ mogłaby spełniać rolę fizjologicznego inhibitora adhezji (178,179), z którymi to poglądami polemizowali inni badacze (180-182). Wyniki niniejszej pracy świadczą o tym, że PGI₂ ma słabe własności antyadhezyjne i nie może spełniać roli endogennego inhibitora adhezji. W modelu adhezji płytek do kolagenu III antyadhezyjne działanie PGI₂ występuje jedynie w stężeniach >0.1μM (stężenia tak wysokie nie mają żadnego znaczenia fizjologicznego lub terapeutycznego), natomiast w modelu adhezji płytek do ECM prostacyklina (<10μM) nie wykazuje żadnego działania hamującego. Również endogenna PGI₂ (<50nM) nie wpływa na proces adhezji płytek do EC, gdyż całkowite zahamowanie jej biosyntezy przez aspirynę nie zmienia warunków adhezji.

1.1.2. Tlenek azotu i EDRF jako inhibitory adhezji.

Wyniki zawarte w niniejszej pracy dostarczyły po raz pierwszy dowodów na to, że zarówno EDRF jak i NO posiadają własności antyadhezyjne. Stymulowana przez trombinę adhezja płytek do EC ulega dwukrotnemu zmniejszeniu w obecności EDRF. Egzogeny NO hamuje również adhezję płytek do innych składników tkanki łącznej podścieliskowej : w obecności wysokich stężeń NO (10μM) adhezja do kolagenu III ulega całkowitemu zahamowaniu, podczas gdy adhezja do ECM jest zmniejszana 2 razy. Różnice w stopniu hamowania adhezji

między kolagenem III a ECM wynikają prawdopodobnie z faktu, że w ECM oprócz kolagenu inne białka takie jak fibronektyna i laminina (183,184) mogą zwiększać adhezję płytek do tej powierzchni i osłabiać działanie NO.

1.2. Agregacja.

1.2.1. Hamowanie agregacji i pobudzanie dezagregacji płytek przez EDRF.

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają obserwacje Azumy i kolegów wskazujące na antyagregacyjne własności EDRF (161). Komórki śródbłonna hodowane na mikronośnikach, w obecności Bk, produkują EDRF w ilościach wystarczających dla zahamowania agregacji wywołanej przez maksymalnie skuteczne ilości kolagenu III i U46619. Działanie EDRF zależy od ilości stymulowanych komórek, od stężenia Bk, natomiast nie jest zależne od wydzielania endogennej PGI₂, gdyż zahamowanie jej syntezy przez indometacynę nie zmienia hamujących własności EDRF. Antyagregacyjne działanie EDRF jest nietrwałe i zanika z 1/2 t ok. 2min.

Jak wykazano po raz pierwszy w niniejszej pracy, EDRF wykazuje działanie dezagregacyjne, pobudzając rozpad agregatów płytkowych utworzonych w wyniku działania kolagenu lub U46619. W opisywanych warunkach doświadczalnych ilości EDRF nie były jednak wystarczające per se dla wywołania maksymalnego działania dezagregacyjnego (patrz poniżej).

1.2.2. Porównanie anty i dezagregacyjnych własności NO z PGI₂.

Tlenek azotu jest skutecznym inhibitorem agregacji płytek wywołanej przez ADP, kolagen III, trombinę, U46619 lub jonofor wapniowy A23187, ale siła jego działania jest ok. 100 razy mniejsza od PGI₂. Również dezagregacyjne działanie NO występuje w stężeniach 100-200 razy większych od podobnie działających stężeń PGI₂, jednakże efekt maksymalnie skutecznych ilości tych substancji jest podobny i dotyczy ok. 2/3 spośród zagregowanych płytek.

2. Komórki śródbłonna uwalniają NO, który odpowiada za antyadhezyjne i zmniejszające agregację działanie EDRF.

W tabeli 6 porównano biologiczny i farmakologiczny profil działania EDRF z NO na płytki.

Tabela 6. Działanie EDRF i NO na płytki oraz jego modyfikacja przez niektóre związki farmakologiczne.

Własność	EDRF	NO
Hamowanie adhezji	+	+
Hamowanie agregacji	+	+
Pobudzanie dezagregacji	+	+
Osiabianie ww. działań przez Hb i Fe ²⁺	+	+
Potęgowanie ww. działań przez SOD, MB22948 i MY5445	+	+
Synergizm z PGI ₂	+	+

Z danych zawartych w tej tabeli wynika, że działanie EDRF na płytki jest zbieżne z NO. Wykazano również, że stymulowane EC produkują NO w ilościach wystarczających dla wywołania efektu biologicznego, który przypisuje się EDRF.

Podsumowując, dane te przemawiają za słuszością hipotezy, że biologiczne działanie EDRF, jest związane z uwalnianiem NO z EC, i że struktura chemiczna EDRF jest tożsama z NO (130,134).

3. Hipoteza synergistycznego hamowania procesu aktywacji płytek krwi.

3.1. Koncepcja pojedynczego inhibitora.

Odkrycia TXA_2 i PGI_2 nadały nowy wymiar badaniom nad fizjologiczną regulacją procesu aktywacji płytek krwi. Wielka aktywność tych związków (nM) umożliwiła wysunięcie hipotezy zakładającej, że subtelna równowaga pomiędzy proagregacyjnym działaniem TXA_2 a anty i dezagregacyjnym efektem PGI_2 warunkuje sprawne funkcjonowanie procesu hemostazy (185,186). Kluczowym elementem dla zweryfikowania tej hipotezy było stwierdzenie obecności PGI_2 we krwi in vivo. Badania z zastosowaniem biologicznych detektorów PGI_2 wykazały, że pobudzenie śródbłonna naczyń płucnych przez angiotenzynę II, bradykininę i acetylocholinę wiąże się z wydzielaniem biologicznie czynnych ilości PGI_2 (187-191). Spostrzeżenia te nasunęły myśl, że PGI_2 mogłaby mieć charakter hormonu uwalnianego przez płuca do krążenia ogólnego (188,190). Hipotezę tę krytykowano głównie w oparciu o wyniki badań

z zastosowaniem spektrometrii masowej, które wskazywały na to, że poziom krążącej PGI_2 jest za niski, aby per se mógł hamować czynność płytek (192).

3.2. Koncepcja synergistycznego działania kilku inhibitorów.

W niniejszej pracy wykazano istnienie zjawiska synergizmu NO z PGI_2 w ich działaniu na płytki. Zjawisko to polega na tym, że podprogowe (nieaktywne per se) ilości tych mediatorów, działając wspólnie potęgują swoje działanie i hamują proces aktywacji płytek krwi.

3.2.1. Synergizm w hamowaniu agregacji i pobudzaniu dezagregacji płytek. Rola NO, PGI_2 , prostaglandyny D_2 oraz plazminy.

Zjawisko to jest najlepiej widoczne w tych doświadczeniach, w których EC stymulowano przy pomocy niskich stężeń Bk (1nM), powodujących wydzielanie niezwykle małych ilości NO i PGI_2 , które pozostawały poniżej progów detekcji metod chemiluminescencyjnej i radioimmunologicznej. Te minimalne ilości były jednak wystarczające dla zahamowania agregacji płytek. Doświadczenia z zastosowaniem swoistych blokerów (indometacyny dla PGI_2 i Hb dla NO) sugerują, że w proponowanym układzie synergistycznym ważniejszą rolę spełnia PGI_2 , gdyż jej usunięcie ze środowiska reakcji całkowicie znosi antyagregacyjne własności EC. Należy jednak pamiętać, że trwałość NO jest mniejsza od PGI_2 , stąd rzeczywiste działanie NO (w warunkach bezpośredniego kontaktu między płytkami a komórkami śródbłonna in vivo) może być większe niż wynika to z doświadczeń, w których występowało kilkusekundowe opóźnienie spowodowane filtrowaniem inkubatu EC. Filtrowanie to było technicznie niezbędne, gdyż obecność kuleczek mikronośnika w kuwecie uniemożliwia monitorowanie

agregacji płytek. Synergistyczne działanie PGI_2 i NO jest recyprokalne (tzn. obydwa inhibitory wzajemnie potęgują swoje działanie) i dotyczy agregacji wywołanej przez różne czynniki agregacyjne. Synergistyczny układ NO- PGI_2 może być dodatkowo wzmocniony, gdyż antyagregacyjne działanie prostacykliny jest potęgowane przez plazminę i tkankowy aktywator plazminogenu, a działanie EDRF przez prostaglandynę D_2 (193-195).

3.2.2. Synergizm w hamowaniu adhezji :NO i.....?

Antyadhezyjne działanie NO nie jest potęgowane przez endogenną PGI₂, gdyż zahamowanie biosyntezy tego prostanoidu przez aspirynę nie modyfikuje efektu NO. W obecności Hb dochodzi jednakże do zniesienia hamującego działania NO, co prowadzi do adhezji do EC ok. 11% spośród płytek obecnych w środowisku reakcji. Obserwację tę można interpretować przynajmniej w dwojaki sposób : a. synergistyczny układ adhezyjny tworzą razem z NO nieprostanoidowe mediatory n.p. tkankowy aktywator plazminogenu lub peptyd związany z genem kalcytoniny (196) ; b. NO jest najistotniejszym czynnikiem o działaniu antyadhezyjnym , jednakże regulacja adhezji dotyczy jedynie części krążących płytek krwi. Ta druga możliwość jest szczególnie atrakcyjna w świetle badań , wskazujących na to , że populacja krążących płytek składa się z dwóch subpopulacji tzw. płytek cięższych i lżejszych, z których płytki cięższe mają większe znaczenie proadhezyjne od płytek lżejszych (197-199).

3.2.3. Znaczenie synergistycznego hamowania procesu aktywacji płytek.

Synergistyczny układ ograniczający aktywację płytek ma istotne biologiczne zalety : jest oszczędny, gdyż operuje w oparciu o obecność minimalnych ilości inhibitorów oraz jest bardziej niezawodny, albowiem jego działanie nie opiera się na jednym

ogniwi, które łatwo może ulegać uszkodzeniu. Uszkodzenie jednego z ogniw w łańcuchu synergistycznym prowadzi raczej do kompensacyjnego wzrostu aktywności pozostałych : wykazano, że przewlekłe stosowanie aspiryny (hamującej biosyntezę PGI_2) zwiększa aktywność fibrynolityczną krwi (200,201).

4. Rola cykazy guanylowej w procesach hamowania adhezji i agregacji płytek.

Jak wspomniano (podrozdział Eksperymentalne przesłanki i cel pracy we Wprowadzeniu), na hamujące działanie układu cykazy guanylowej w procesie aktywacji płytek wskazywali już Mellion i koledzy (160), którzy wykazali, że antyagregacyjne działanie nitrozoamin koreluje z powstawaniem cGMP w płytkach. Działanie cGMP tak jak i cAMP w płytkach jest krótkotrwałe, a wiąże się to z aktywnością enzymów hydrolizujących cykliczne nukleotydy : esterazy dwufosforanowej wybiórczo rozkładającej cGMP (cGMP PDE) oraz siostrzanego enzymu wybiórczo rozkładającego cAMP (cAMP PDE) (202). Selektywne zahamowanie działania cGMP PDE lub cAMP PDE potęguje biologiczne działanie odpowiednio cGMP lub cAMP (203). W niniejszej pracy posłużono się selektywnymi inhibitorami cGMP PDE oraz cAMP PDE celem farmakologicznego odróżnienia efektów zależnych od cGMP od efektów zależnych od powstawania cAMP. Jako farmakologicznych wyznaczników cGMP użyto dwóch różniących się chemicznie selektywnych inhibitorów cGMP PDE : MB22948 i MYS454 (204,205). Działanie tych inhibitorów porównano z efektem

selektywnego inhibitora cAMP PDE - związku HL725 oraz z efektem IBMX - nieselektywnego inhibitora esteraz dwufosforanowych w płytkach (206,207).

4.1.Rola układu cyklicznej guanylowej w hamowaniu adhezji płytek

Hamujące działanie NO na adhezję płytek do kolagenu III,ECM i EC ulega spotęgowaniu przez MB22948 lub MY5445 , ale nie jest modyfikowane przez HL725.Potęgujące działanie selektywnych inhibitorów cGMP PDE oraz brak efektu selektywnego inhibitora cAMP PDE dowodzą, że antyadhezyjne własności NO zależą od powstawania cGMP, ale nie cAMP w płytkach.

W modelu adhezji płytek do kolagenu III, słabe antyadhezyjne działanie PGI_2 ulega zwiększeniu w obecności MB22948 lub MY5445 podczas gdy HL725 w sposób znamieny nie modyfikuje działania tego prostanoïdu. Wyniki te wskazują, że : a .stosowanie wysokich (>30nM) stężeń PGI_2 oprócz swoistego pobudzenia układu cyklicznej adenylowej prowadzi do nieswoistej stymulacji układu cyklicznej guanylowej i powstawania cGMP (106); b. powstawanie cAMP nie ma większego znaczenia dla procesu hamowania adhezji płytek.

4.2.Rola układów : cyklicznej guanylowej i cyklicznej adenylowej w zmniejszaniu agregacji płytek.

Antyagregacyjne i dezagregacyjne działanie podprogowej ilości NO lub PGI_2 ujawnia się w obecności selektywnych inhibitorów odpowiednio cGMP lub cAMP PDE.Wyniki te potwierdzają prace tych

badaczy, którzy wykazali, że powstawanie zarówno cGMP jak i cAMP prowadzi do zmniejszenia zdolności agregacyjnych płytek (160,208).

4.3. Cykliczny GMP uruchamia mechanizmy obniżające $[Ca^{2+}]_i$ w płytkach.

Porównanie antyagregacyjnego działania NO na agregację wywołaną różnymi czynnikami agregacyjnymi wskazuje, że jest on najmniej skuteczny w hamowaniu agregacji wywołanej jonoforem wapniowym A23187. W obecności tego związku dochodzi bowiem do znacznego wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ w wyniku przechodzenia zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} do wnętrza jak i poprzez mobilizację Ca^{2+} z frakcji kanalików do cytoplazmy płytki (208). Cykliczny GMP obniża $[Ca^{2+}]_i$ poprzez zmniejszanie aktywności PLC i hamowanie powstawania endogennych jonoforów oraz przez pobudzenie aktywności pompy odpowiedzialnej za sekwestrację Ca^{2+} we frakcji kanalików płytkowych (209-213).

4.4. Interakcja układu cyklicznej guanylowej z adenylową.

Współdziałanie tych układów ze sobą warunkuje prawdopodobnie synergistyczny efekt NO i PGI_2 . Teoretycznie może ono dotyczyć każdego z mechanizmów efektorowych dla cGMP i cAMP jak i wpływu na aktywność cGMP i cAMP PDE. Precyzyjna równowaga pomiędzy procesami

powstawania i rozkładu cyklicznych nukleotydów może zostać zachwiana w obecności nadmiernych stężeń stymulatora (214), czym można tłumaczyć zahamowanie antyadhezyjnego działania NO w obecności wysokich stężeń PGI₂ oraz brak potęgowania dezagregacji w czasie interakcji wysokich stężeń NO i PGI₂.

Rycina 22 stanowi schematyczną ilustrację koncepcji o centralnej roli [Ca²⁺]_i w synergistycznym działaniu mediatorów wpływających na proces aktywacji płytek krwi.

5. EDRF, prostacyklina a choroba naczyniowo-zakrzepowa.

Miażdżyca naczyń upośledzająca sprawność narządu krążenia, stanowi jeden z najważniejszych problemów zdrowotnych. Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że zmienione miażdżycowo naczynia wykazują zmniejszoną zdolność do produkcji PGI₂ (215). Podkreśla się, że nadtlutki lipidów, znajdujące przeważnie we frakcji lipoproteidów o niskiej gęstości (LDL), hamują biosyntezę PGI₂ poprzez upośledzenie czynności syntetazy prostacykliny (216). Paradoksalnie, w zaawansowanej miażdżycy u człowieka, dochodzi do zwiększonego wydzielania PGI₂ (217), co może być wynikiem uwalniania z płytek substancji pobudzających uwalnianie tego prostanoidu takich jak serotonina lub PAF.

Zmniejszone powstawanie lub zwiększone unieczynnianie EDRF zaobserwowano w różnych postaciach choroby naczyniowo-zakrzepowej. Zmniejszoną generację EDRF stwierdzono w

zmienionych miażdżycowo : naczyniach wieńcowych człowieka i miniaturowej świni (218-220). Ponadto, miażdżycowo zmienione krążki aorty królika tracą zdolność do syntezy cGMP i rozszerzania w obecności EDRF wyprodukowanego przez naczynia zdrowe (219-223)

Zahamowanie powstawania EDRF w miażdżycy wiąże się z działaniem tlenowych wolnych rodników obecnych w LDL (224).

Choroba nadciśnieniowa stanowi następny istotny problem we współczesnej kardiologii. Nie ulega dzisiaj najmniejszej wątpliwości, że płytki krwi ulegają aktywacji w toku choroby nadciśnieniowej (225-228). Stwierdzono, że naczynia krwionośne pochodzące od zwierząt z chorobą nadciśnieniową produkują mniej EDRF i cGMP niż naczynia kontrolne (229,230). Tak więc, jedną z przyczyn aktywacji płytek w tej chorobie może być śródbłonkowy deficyt EDRF.

Do zaburzeń w biosyntezie EDRF dochodzi również w doświadczalnie wywołanej cukrzycy (231), a zmniejszona zdolność śródbłonka do wytwarzania EDRF jest prawdopodobnie odpowiedzialna za powstawanie zakrzepów w przeszczepach żylnych, budujących pomost wieńcowy (232)

W czasie krwawienia podpajęczynówkowego stwierdza się w płynie mózgowo-rdzeniowym spore ilości Hb. Postuluje się, że w obecności Hb dochodzi do inaktywacji EDRF, co sprzyja powikłaniom wazospastycznym i zakrzepowym tego krwawienia (233).

Podsumowując, większość badaczy podziela pogląd, że w chorobie

naczyniowo-zakrzepowej ściana naczyń wytwarza mniej EDRF i PGI₂ niż ściana naczyń zdrowego. W dalszym ciągu pozostaje jednak nierozwiązane istotne pytanie : czy zaburzenia w biosyntezie mediatorów są przyczyną czy skutkiem tej choroby? W tym kontekście pewnego znaczenia nabiera fakt, że w toku zapalenia naczyń u królików, wywołanego przez podawanie obcogatunkowej surowicy, obniżenie zdolności naczyń tętniczych do wytwarzania PGI₂ obserwuje się przed wystąpieniem zmian morfologicznych dostrzegalnych technikami mikroskopii świetlnej i elektronowej (12).

6. Terapeutyczne znaczenie NO i PGI₂.

W niektórych krajach PGI₂ została zatwierdzona jako lek i jest dostępna pod nazwami handlowymi: Epoprostenol lub Flolan. Lek ten stosuje się rutynowo celem zapobiegania aktywacji płytek w czasie zabiegów chirurgicznych w krążeniu pozaustrojowym. Przeprowadzone próby kliniczne wykazały przydatność PGI₂ w leczeniu niektórych postaci choroby naczyniowo-zakrzepowej (dla ref. patrz 234). Ze względu na niską trwałość chemiczną i metaboliczną PGI₂ potencjalnie większe znaczenie mają trwałe analogi tego leku, których prototypami są karbacyklina i iloprost (235, 236). Teoretycznie najlepszymi analogami mogłyby okazać się te o wybiórczym działaniu na płytki lub naczynia krwionośne, bądź

obdarzone działaniem cytoprotekcyjnym.

Leki o działaniu zbliżonym do nitrogliceryny (azotany) mają podstawowe znaczenie w leczeniu choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego. W świetle przytoczonych badań EDRF można uważać za endogenną nitroglicerynę. Fakt ten stwarza racjonalne podstawy dla zastosowania azotanów w chorobie naczyniowo-zakrzepowej. Spośród nich największy potencjał przeciwzakrzepowy mają związki farmakologiczne samoistnie uwalniające NO takie jak nitroprusydek sodowy lub aktywny metabolit molzydminy - SIN-1 (237). Przeciwzakrzepowe działanie nitrogliceryny i jej bliskich pochodnych można zwiększyć poprzez jednoczesowe zastosowanie N-acetylocysteiny, która przyspiesza powstawanie w ustroju S-nitrozotioili (238). S-nitrozotiole są silnymi aktywatorami cykazy guanylowej, tak więc stosowanie N-acetylocysteiny ma również istotne znaczenie w zwalczaniu zjawiska oporności, które występuje u pacjentów przewlekle leczonych pochodnymi nitrogliceryny (239,240).

7. Perspektywy i kierunki badań

7.1. Poszukiwanie nowych regulatorów procesu aktywacji płytek krwi.

Dotyczy to zarówno substancji aktywujących jak i hamujących adhezję i agregację. Z nowo odkrytych substancji, własności regulacyjne może mieć endotelina-naczyniozważający peptyd produkowany przez śródbłonek, którego mechanizm działania związany jest z modulacją przechodzenia zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} do

komórki (241).

7.2. Poznanie biologicznego działania EDRF.

7.2.1. Działanie cytoprotekcyjne.

Ostatnie badania sugerują, że NO ma również działanie cytoprotekcyjne na płytki krwi, chroniąc je przed zniszczeniem w czasie ich izolacji z krwi i przechowywania zawiesin płytkowych (242). Efekt ten jest związany albo z wywoływanym przez cGMP obniżeniem $[Ca^{2+}]_i$, albo z inaktywacją wolnych rodników tlenowych przez NO (243). Obydwa mechanizmy mogłyby również odpowiadać za cytoprotekcyjne działanie NO na izolowane leukocyty obojętnochłonne (244). Krwinki te mają także zdolność do produkcji NO (245). Biologiczne znaczenie tego faktu wymaga dalszych badań, aczkolwiek powstający NO w leukocytach mógłby ograniczać skutki wolnorodnikowego "wybuchu", który ma miejsce w czasie aktywacji tych komórek. W warunkach patologicznych, zaburzenia w powstawaniu NO, będące n.p. skutkiem niedokrwienego zahamowania czynności enzymu syntetyzującego, mogłyby zatem być odpowiedzialne za wolnorodnikowe uszkodzenie mięśnia sercowego w czasie reperfuzji (246).

Interesujące reperkusje mogą mieć również badania nad ewentualnym działaniem cytoprotekcyjnym NO na takie tkanki jak śluzówka żołądka lub tkanka mózgowa.

7.3. Synergizm farmakologiczny a poszukiwanie skuteczniejszych leków przeciwplatekcyjnych.

Przeciwpłytkowe działanie podprogowych ilości NO i PGI₂ jest silnie potęgowane przez selektywne inhibitory cGMP lub cAMP PDE i przez SOD. Odkrycie to wskazuje na potrzebę sformułowania i klinicznego zbadania ww. kombinacji związków farmakologicznych. Kombinacje te bowiem mogą przyczynić się do podwyższenia skuteczności i obniżenia toksyczności leczenia przeciwpłytkowego. Pierwszy kliniczny sygnał o słuszności stosowania synergistycznie działających leków w terapii przeciwzakrzepowej stanowią wyniki Second International Study of Infarct Survival (ISIS-2), które wykazały, że łączne podawanie aspiryny i streptokinazy u pacjentów z ostrą fazą zawału mięśnia sercowego jest skuteczniejszym postępowaniem leczniczym niż stosowanie któregośkolwiek z tych leków oddzielnie (247)

Przedstawione powyżej propozycje nie wyczerpują listy możliwości badawczych. Jak stwierdził Paul Vanhoutte : 'The story of endothelium-derived relaxing factor is the climax of one of the most exciting sagas in vascular physiology and pharmacology.....but it is not the end of the quest!' (248).

APPENDIX

Ostatnio Sneddon i Vane opublikowali pracę potwierdzającą obserwacje o antyadhezyjnym działaniu EDRF (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85,2800-2804,1988).

PISMIENICTWO

1. Radomski MW, Gryglewski RJ. Fizjologiczna rola osi megakariocyty-płytki krwi w procesie hemostazy naczyniowej. W: Ultrastruktura i funkcja komórki. Red. Kawiak J, PWN, w druku.
2. Woolf N. Thrombosis and atherosclerosis. W: Haemostasis and Thrombosis. Red. Bloom AL, Thomas DP, Churchill Livingstone 1981, str. 527-553.
3. Leytin VL, Swiridow DD. A model for studying platelet interaction with cellular and macromolecular constituents of the vessel wall in vitro. W: Vessel wall and thrombogenesis. Red. Chazov EI, Smirnov VN. Springer-Verlag 1982, str. 173-194.
4. White JG, Clawson CC, Gerrard JM. Platelet ultrastructure. W: Haemostasis and Thrombosis. Red. Bloom AL, Thomas DP. Churchill Livingstone 1981, str. 22-49.
5. White JG. Current concepts of platelet structure. Am. J. Clin. Pathol. 71, 363-378, 1979.
6. Read NG, Radomski MW, Goodwin DA, Moncada S. An ultrastructural study of human platelets after washing with prostacyclin. Br. J. Haematol. 60, 305-314, 1985.
7. Turitto VT, Baumgartner HR. Effects of physical factors on

platelet adhesion to subendothelium. *Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl.* 60, 17-24, 1979.

8. Baumgartner HR, Turitto VT, Weiss HJ. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. II. Relationship among platelet adhesion, thrombus dimensions and fibrin formation. *J. Lab. Clin. Med.* 95, 208-221, 1980.

9. Mant MJ, Bach LA. Platelet adherence to collagen: effect of erythrocytes. *Thromb. Res.* 22, 513-518, 1981.

10. De Bono D. White blood cells and vessel wall. W: *Biology and Pathology of the Vessel Wall*. Ed. Woolf N. Praeger Publishers 1983, str. 101-117.

11. Del Principe D, Menichelli A, De Matteis W, Di Corpo ML, Di Giullio S, Finazzi-Agro A. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. *FEBS Letters* 185, 142-146, 1985.

12. Moncada S, Radomski MW. The problems and the promise of prostaglandin influences in atherogenesis. W: *Ann. Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1985, str. 121-130.

13. Mehta P, Mehta J, Lawson D, Konop I. Leukotrienes potentiate the effect of thromboxanes on human platelet aggregation. *Thromb. Res.* 41, 731-738, 1986.

14. Mehta JL, Nichols WW, Mehta F. Neutrophils as potential participants in acute myocardial ischaemia: relevance to reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 11, 1309-1316, 1986.

15. Leytin VL, Misselwith F, Domogatsky SD, Jahn S, Hofman V, Repin VS.

- Platelet prostanoids in interaction of platelets with collagen substrates. I. Activation of platelets by surfaces coated with different types of human collagen. *Biomed. Biochim. Acta* 24, 8331-8334, 1984.
16. Parsons TJ, Haycraft DL, Hoak JC, Sage H. Interaction of platelets and purified collagens in a laminar flow model. *Thromb. Res.* 43, 435-443, 1986.
17. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Role of Factor VIII/von Willebrand factor in interaction of platelets with the vessel wall. W: Interaction of platelets with the vessel wall. *Am. Physiol. Soc.* 1985, str. 139-146.
18. Madri J, Dreyer B, Pitlick FA, Furthmayer H. The collagenous components of the subendothelium: correlation of structure and function. *Lab. Invest.* 43, 303-315, 1980.
19. Janzarik H. 'Spezifische Adhäsion' von thrombozytoiden Zellen und Blutplättchen an Kollagen in vitro. W: Fibrinolyse, Thrombose, Hamostase. Red. Deutsch E, Lechner K. Schattauer Verlag 1980, str. 719-722.
20. Jeleńska M, Kopeć M. Blood platelets cause retraction of collagen gel. *Thromb. Haemostas.* 44, 161-164, 1980.
21. Ruf A, Morgenstern E, Janzarik H, Luscher EF. Morphology of the interaction of collagen fibrils with normal human platelets and thrombastenic platelets. *Thromb. Res.* 44, 477-487, 1986.
22. Jaffe EA, Hayer LW, Nachman RL. Synthesis of von Willebrand factor

by cultured human endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1906, 1974.

23. Niewiarowski S. Platelet release reaction and secreted platelet proteins. W : Thrombosis and Haemostasis. Red. Bloom AL, Thomas DP. Churchill Livingstone 1981, str. 73-83.

24. Turitto VT, Weiss HJ, Zimmerman TS, Sussman II. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. Blood 65, 823-831, 1985.

25. Schneider-Trip MD, Jenkins CSP, Kahle LH, Sturk A, Ten Cate JW, Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet aggregation: binding of factor VIII to platelets. Br. J. Haematol . 43, 99-112, 1979.

26. Turitto VT, Weiss HJ, Baumgartner HR. Decreased platelet adhesion on vessel segments in von Willebrand's disease: a defect in initial platelet attachment. J. Lab. Clin. Med. 102, 551, 1983.

27. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins IIb-IIIa, Ib and storage granules. Blood 67, 322-330, 1986.

28. Pietu G, Cherel G, Marguerie G, Meyer D. Inhibition of von Willebrand factor-platelet interaction by fibrinogen. Nature 308, 648-649, 1984.

29. Timmons S, Kłoczewiak M, Hawiger J. ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to

human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4935-4939, 1984.

30. Doolittle RF. Fibrinogen and fibrin. W: Thrombosis and Haemostasis. Ed. Bloom AL, Thomas DP. Churchill Livingstone 1981, str. 163-191.

31. Kopeć M, Budzyński A, Stachurska J, Wegrzynowicz S, Kowalski E. Studies on the mechanism of interference by fibrinogen degradation products (FDP) with the platelet function. Role of fibrinogen in the platelet atmosphere. Thromb. Diath. Haemorrh. 15, 476-490, 1966.

32. Jackson CM. Biochemistry of prothrombin activation. W: Thrombosis and Haemostasis. Ed. Bloom AL, Thomas DP. Churchill Livingstone 1981, str. 140-162.

33. Zwaal RFA, Hemker HC. Blood cell membranes and haemostasis. Haemostasis 11, 12-39, 1982.

34. Marcus AJ, Zucker-Franklin D. Studies on subcellular platelet particles. Blood 23, 389-393, 1964.

35. Czervionke RL, Haak JC, Fry GL. Effect of aspirin on thrombin-induced adherence of platelets to cultured cells from the blood vessel wall. J. Clin. Invest. 62, 847-856, 1978.

36. Grega GJ. Contractile elements in endothelial cells as potential targets for drug action. Trends Pharmacol. Sci. November 1986, str. 452-457.

37. Vargas JR, Radomski M, Moncada S. The use of prostacyclin in the separation from plasma and washing of human platelets.

Prostaglandins 23,929-945,1982.

38. Barrowcliffe TW, Thomas DP. Antithrombin III and heparin. W: Thrombosis and Haemostasis. Red. Bloom AL, Thomas DP. Churchill Livingstone 1981, str. 712-724.
39. Armstrong RA, Jones RL, Wilson NH. Ligand binding to thromboxane receptors on human human platelets : correlation with biological activity. Br. J. Pharmacol. 79, 953-964, 1983.
40. Haslam RJ, Rosson GM. Aggregation of human platelets by vasopressin. Am. J. Physiol. 223, 958-967, 1972.
41. Filep J, Rosenkranz B. Mechanism of vasopressin - induced platelet aggregation. Thromb. Res. 45, 7-16, 1987.
42. Zawilska KM, Born GVR, Begent NA. Effect of ADP-utilizing enzymes on the arterial bleeding time in rats and rabbits. Br. J. Haematol. 50, 317-325, 1982.
43. Born GVR, Bergquist D, Arfers KE. Evidence for inhibition of platelet activation in blood by a drug effect on erythrocytes. Nature 259, 233-235, 1976.
44. Packham MA, Mustard JF. Clinical pharmacology of platelets. Blood 50, 555-567, 1977.
45. Lingjaerde O. Platelet uptake and storage of serotonin. W: Serotonin in health and disease. Red. Essman WB. Spectrum 1977, str. 139-199.
46. De Clerck F, Xhonneux B, Leysen J, Janssen PAJ. Evidence for functional 5-HT₂ receptor sites on human blood platelets. Biochem.

Pharmacol. 33, 2807-2811, 1984.

47. De Clerck F, David JL, Janssen PAJ. Inhibition of serotonin-induced and -amplified human platelet aggregation by ketanserine (R41468) a selective 5-HT₂-receptor antagonist. Agents and Actions 12, 388-397, 1982.

48. Aleksander RW, Cooper W, Handin RI. Characterization of human alpha adrenergic receptors: correlation of ³H-dihydroergocryptine binding with aggregation and adenylate cyclase inhibition. J. Clin. Invest. 61, 1136-1144, 1978.

49. Daiguji M, Meltzer HY, U'Prichard DC. Human platelet α_2 adrenergic receptors: labelling with ³H-yohimbine, a selective antagonist ligand. Life Sci. 28, 2705-2717, 1981.

50. Rao GHR, Escolar G, White JG. Epinephrine reverses the inhibitory influence of aspirin on platelet-vessel wall interactions. Thromb. Res. 44, 65-74, 1986.

51. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and a platelet activating factor. J. Exp. Med. 136, 1356-1377, 1972.

52. Polonsky J, Tence M, Varenne D, Das BF, Lunel J, Benveniste J. Release of 1-O-alkylglyceryl-3-phosphorylcholine, O-deacetyl platelet activating factor from leukocytes. Chemical ionization mass spectrometry of phospholipids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7019-7023, 1980.

53. Lee TC, Malone B, Wasserman SI, Fitzgerald V, Snyder F. Activities

of enzymes that metabolize platelet activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) in neutrophils from humans and the effect of a calcium ionophore. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1303-1308, 1982.

54. Chilton FH, Ellis JM, Olson SC, Wykel RL. 1-O-alkyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine. A common source of platelet activating factor and arachidonate in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 259, 12014-12019, 1984.

55. Bussolino F, Camussi G, Aglietta M, Braquet P, Bosia A, Pescarmona G, Savario F, D'Urso N, Marchisio PC. Human endothelial cells are target for platelet activating factor (PAF). I. PAF induces changes in cytoskeleton structures. *J. Immunol.*, w druku.

56. Chignard M, Le Cuedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J, The role of platelet activating factor in platelet aggregation. *Nature* 275, 799-800, 1979.

57. Wal F, Joseph D, Touqui L, Vargaftig BB. PAF-acether may not mediate the third pathway of platelet aggregation since self-desensitization reduces the effects of low thrombin but enhances those of convulxin. *Thromb. Haemost.* 53, 99-104, 1985.

58. Johnson M, Carey F, Mc Millan R. Alternative pathways of arachidonate metabolism: prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Essays Biochem.* 19, 41-141, 1983.

59. Bills TK, Smith JB, Silver MJ. Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to

thrombin. J. Clin. Invest. 60, 1-6, 1977.

60. Billah MME, Lapetina EG, Cuatrecasas P. Phospholipase A₂ and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca²⁺ requirement, pH dependence and cellular localization. J. Biol. Chem. 255, 10227-10281, 1980.

61. Mahadezappa VG, Holub BJ. Relative degradation of different molecular species of phosphatidylcholine in thrombin-stimulated human platelets. J. Biol. Chem. 259, 9369-9373, 1984.

62. Broekman MJR, Handin A, Derksen A, Cohen P. Distribution of phospholipids, fatty acids and platelet factor 3 among subcellular fractions of human platelets. Blood 47, 963-971, 1976.

63. Broekman MJ. Stimulated platelets release equivalent amounts of arachidonate from phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and inositides. J. Lip Res. 27, 884-891, 1986.

64. Lapetina EG. Role of phospholipases C and A₂ in the activation of platelets. Symposium: Antiplatelet and antithrombotic drugs. IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology London 1984.

65. Nugteren DH, Halzelhof E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. Biochem. Biophys. Acta 326, 448-461, 1973.

66. Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 899-903, 1973.

67. Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. Novel

transformations of arachidonic acid in human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3400-3404, 1974.

68. Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. J. Biol. Chem. 251, 2629-2636, 1976.

69. Ogino N, Miyamoto T, Yamamoto S, Hayaisji O. Prostaglandin endoperoxide E isomerase from bovine vesicular microsomes, a glutathione-requiring enzyme. J. Biol. Chem. 252, 890-895, 1977.

70. Shimizu T, Yamamoto S, Hayaishi O. Purification and properties of prostaglandin D synthetase from rat brain. J. Biol. Chem. 254, 5222-5228, 1979.

71. Nugteren DH. Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. Biochim. Biophys. Acta 380, 299-307, 1975.

72. Siegel MI, McConnell RT, Porter NA, Cuatrecasas P. Arachidonate metabolism via lipoxygenase and 12-L-hydroperoxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid peroxidase sensitive to anti-inflammatory drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 308-312, 1980.

73. Mazurov AV, Leytin VL, Repin VS, Taube CH, Förster W. Platelet prostanoids in interaction of platelets with collagen substrates. II. Effects of exogenous arachidonic acid, stable PG endoperoxides analogue and aspirin. Biomed. Biochim. Acta 43, 5373-5376, 1984.

74. Packham MA, Cazenave JF, Kinlough-Rathbone RL, Mustard JF. Drug effects on platelet adherence to collagen and damaged vessel

walls. *Adv. Exp. Med. Biol.* 109, 253-276, 1978.

75. Hamberg M, Svensson J; Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2994-2998, 1975.

76. Radomski M. The biological role of thromboxane A_2 in the process of haemostasis and thrombosis. *Pharmacology and perspectives of therapeutical use of thromboxane synthetase inhibitors and receptor PGH_2/TXA_2 antagonists.* *Acta Physiol. Pol.* 36, 153-164, 1985.

77. Halushka FV, Mais DE, Saussy DLJ. Platelet and vascular smooth muscle thromboxane A_2 /prostaglandin H_2 receptors. *Fed. Proc.* 46, 149-153, 1987.

78. Dutilh CE, Haddeman E, Ten Hoor F. Role of arachidonate lipoyxygenase pathway in blood platelet aggregation. *W: Adv. Prostagl. Thromboxane Res.* vol 6. Ed. Samuelsson B, Ramwell FW, Paoletti R. Raven Press 1980, str. 101-105.

79. Aharony D, Smith JB, Silver MJ. Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoyxygenase product 12-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 193-200, 1982.

80. Soms AR, Sprecher H, Saukrappa SK, Needleman P. Selective inhibitors of platelet arachidonic acid metabolism: aggregation independent of lipoyxygenase. *W: Leukotrienes and other lipoyxygenase products.* Ed. Samuelsson B, Paoletti R. Raven Press 1982, str. 19-28.

81. Rao GHR, Gerrard JM, Withop CJ, White JG. Platelet aggregation independent of prostaglandin synthesis in patients with Hermansky-

- Pudlak syndrome. *Prostagl. Med.* 6, 459-472, 1981.
82. Thompson NT, Scrutton MC, Wallis RB. Synergistic responses in human platelets. Comparison between aggregation, secretion and cytosolic Ca^{2+} concentration. *Eur. J. Biochem.* 161, 399-408, 1986.
83. Abdel-Latif AA. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* 38, 227-273, 1986.
84. Rasmussen H, Barret P. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol. Rev.* 64, 938-984, 1984.
85. Cutler L, Rodan G, Feinstein M. Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATP-ases in the dense tubular system of human blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 542, 357-371, 1978.
86. Wong FYK, Cheung WY. Calmodulin stimulates human platelet phospholipase A_2 . *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 90, 473-480, 1979.
87. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor: biological interactions and significance. *W: Thrombosis and Haemostasis 1987*. Ed. Verstraete M, Lijnen HR, Arnout J. Leuven University Press 1987, str. 597-618.
88. Vane JR, Gryglewski RJ, Botting R. The endothelial cell as a metabolic and endocrine organ. *Trends Pharmacol. Sci.* December 1987, str. 491-496.
89. " Lückhoff A. Release of prostacyclin and EDRF from endothelial cells is differentially controlled by extra and intracellular

calcium. *Eicosanoids* 1,5-11,1988.

90. Blackwell GJ, Flower RJ, Russell-Smith N, Salmon JA, Thorogood FB, Vane JR. 1-n-butylimidazole: A potent and selective inhibitor of 'thromboxane synthetase'. *Br. J. Pharmacol.* 64, 436P, 1978.

91. Moncada S, Gryglewski RJ, Bunting S, Vane JR. A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins* 12, 715-733, 1976.

92. Moncada S, Gryglewski RJ, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263, 663-665, 1976.

93. Face-Asciak CR. Isolation, structure and biosynthesis of 6-keto-PGF_{1α} in the rat stomach. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 2348-2349, 1979.

94. Wong FYK, McGiff JC, Sun FF, Malik KV. Pulmonary metabolism of prostacyclin (PGI₂) in the rabbit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 731-738, 1978.

95. Wong FYK, McGiff JC, Sun FF, Lee WH. 6-keto-prostaglandin E₁ inhibits the aggregation of human platelets. *Eur. J. Pharmacol.* 60, 245-248, 1979.

96. Gryglewski RJ, Korbut R, Radomski M. Transformation of prostacyclin by horse platelet cytosole to a stable metabolite which has fibrinolytic activity in vitro. *Proc. USA-Poland Symposium Cardiovascular Disease, June 1984, Warsaw, Poland, str. 9-16.*

97. Whittle BJR, Moncada S, Vane JR. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI_2), prostaglandin E_1 and D_2 on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins* 3, 373-388, 1978.
98. Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A. Generation of prostacyclin by lungs in vivo and its release into arterial circulation. *Nature* 273, 765-767, 1978.
99. Dusting GJ, Moncada S, Vane JR. Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins* 13, 3-6, 1977.
100. Armstrong JM, Lattimer N, Moncada S, Vane JR. Comparison of the vaso-depressor effects of prostacyclin and 6-oxo-prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ with those of prostaglandin E_2 in rats and rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 62, 125-130, 1978.
101. Fitzgerald GA, Dargie HJ, Watkins J, Brown MJ, Friedman LA, Lewis PJ. Cardiac effects of prostacyclin in man. In: *Clinical pharmacology of prostacyclin*. Ed. Lewis PJ, O'Grady J. Raven Press 1981, str. 145-152.
102. Utsunomiya T, Krausz MM, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Treatment of pulmonary embolism with prostacyclin. *Surgery* 88, 25-30, 1980.
103. Korbut R, Byrska-Danek A, Gryglewski RJ. Fibrinolytic activity of 6-keto-prostaglandin E_1 . *Thromb. Haemost.* 50, 893, 1983.
104. Whittle BJR, Kaufman GL, Boughton-Smith NK. Stimulation of gastric alkaline secretion by stable prostacyclin analogues in rat

and dog. *Eur. J. Pharmacol.* 100, 277-283, 1984.

105. Araki H, Lefer AM. Role of prostacyclin in the preservation of ischemic myocardial tissue in the perfused cat heart. *Circ. Res.* 47, 757-763, 1980.

106. Sikujara O, Monden M, Toyoshima K, Okamura J, Kosaki G. Cytoprotective effect of prostaglandin I_2 on ischaemia-induced hepatic cell injury. *Transplantation* 36, 238-242, 1983.

107. Blackwell GJ, Radomski M, Vargas JR, Moncada S. Prostacyclin prolongs viability of human washed platelets. *Bioch. Biophys. Acta* 718, 60-65, 1982.

108. Radomski M, Moncada S. An improved method for washing of human platelets with prostacyclin. *Thromb. Res.* 30, 383-389, 1983.

109. Moncada S, Radomski M, Vargas JR. Preparation of washed platelets from human blood. *Br. Pharmacol. Soc.* 16-18 December 1981, Abstracts P82.

110. Hajjar DP, Weksler BB. Metabolic activity of cholesteryl esters in aortic smooth muscle cells is altered by prostaglandin I_2 . *J. Lip. Res.* 24, 1176-1185, 1983.

111. Sinzinger H, Zidek T, Fitscha D, O'Grady J, Wagner D, Kaliman J. Prostaglandin I_2 reduces activation of human arterial smooth muscle cells in vivo. *Prostaglandins* 33, 915-918, 1987.

112. Schafer AI, Cooper B, O'Hara D, Handin R. Identification of platelet receptors for prostaglandin I_2 and D_2 . *J. Biol. Chem.* 254, 2914-2917, 1979.

113. Miller OV, Gorman RR. Evidence for distinct prostaglandin I₂ and D₂ receptors in human platelets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 210, 134-140 1979.
114. Schillinger E, Prior G. Prostaglandin I₂ receptors in a particulate fraction of platelets of various species. *Bioch. Pharmacol.* 29, 2297-2299, 1980.
115. Aktories K, Jakobs KH. Regulation of platelet cyclic AMP formation. W: *The platelets: physiology and pharmacology*. Red. Longenecher GL. Academic Press 1985, str. 271-287.
116. Jakobs KH, Watanabe Y, Bauer S. Interactions between the hormone sensitive adenylate cyclase system and the phosphoinositide-metabolizing pathway in human platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8(8), S61-S64, 1986.
117. Kaser-Glanzman R, Jacobova M, George JN, Löscher EF. Stimulation of calcium uptake in platelet membrane vesicles by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and protein kinase. *Bioch. Biophys. Acta* 466, 429-440, 1977.
118. Watson SP, McConnel RT, Lapetina EG. The rapid formation of inositol phosphates in human platelets by thrombin is inhibited by prostacyclin. *J. Biol. Chem.* 259, 13199-13203, 1984.
119. Buchanan MR, Butt RW, Magas Z, van Ryn J, Hirsh J, Nazir DJ. Endothelial cells produce a lipoxygenase derived chemo-repellant which influences platelet-endothelial cells interactions-effect of aspirin and salicylate. *Thromb. Haemost.* 24, 306-311, 1985.

120. Buchanan MR, Haas TA, Lagarde M, Guichardant M.
13-hydroxyoctadecadienoic acid is the vessel wall chemorepellant factor, LOX. *J. Biol. Chem.* 260, 16056-16059, 1985.
121. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376, 1980.
122. Griffiths TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* 308, 645-647, 1984.
123. Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 175-179, 1984.
124. Forsterman V, Trogisch G, Busse R. Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived relaxing factor 106, 639-643, 1985.
125. Singler HA, Saye JA, Peach MJ. Effects of cytochrome p-450 inhibitors on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Blood Vessels* 21, 223-230, 1984.
126. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. *W: Mechanisms of vasodilatation vol. 4. Red. Vanhoutte PM. Raven Press , w druku.*

127. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. W: Mechanisms of vasodilatation vol. 4. Red. Vanhoutte PM. Raven Press w druku.
128. Gryglewski RJ, Moncada S, Palmer RMJ. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 87, 685-694, 1986.
129. Vane JR. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 23, 360-373, 1964.
130. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526, 1987.
131. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454-456, 1986.
132. Moncada S, Palmer RMJ, Gryglewski RJ. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9164-9168, 1986.
133. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250, H222-H227, 1986.
134. Hutchinson PJA, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. *Eur. J. Pharmacol* 141,

445-451, 1987.

135. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232, 708-716, 1985.

136. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265-9269, 1987.

137. Moncada S, Herman AG, Vanhoutte P. Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* October 1987, str. 366-368.

138. Long CJ, Stone TW. The release of endothelium-derived relaxing factor is calcium-dependent. *Blood Vessels* 22, 205-208, 1985.

139. Peach MJ, Singer HA, Izzo NJ, Loeb AL. Role of calcium in endothelium-dependent relaxation of arterial smooth muscle. *Am. J. Cardiol.* 59, 35A-43A, 1987.

140. Tayo FM, Bevan JA. Extracellular calcium dependence of contraction and endothelium-dependent relaxation varies along the length of the aorta and its branches. *J. Pharmacol, Exp, Ther.* 240, 594-601, 1987.

141. Gryglewski R, de Nucci G, Warner T, Bearpack T, Vane JR. Phospholipase C releases endothelium derived relaxing factor (EDRF) from bovine aortic endothelial cells (BAEC). *Proc. Br. Pharmacol. Soc.* 6-8 January 1988. Abstracts C143.

142. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666, 1988.
143. Sakuma I, Stuehr D, Gross SS, Nathan C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, w druku.
144. Schmidt HHH, Klein MM, Niroomand F, Böhme E. Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide? *Eur. J. Pharmacol.* 148, 293-295, 1988.
145. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 153, 1251-1256, 1988.
146. Thomas G, Ramwell FW. Peptidyl arginine deiminase and endothelium dependent relaxation. *Eur. J. Pharmacol.* 153, 147-148, 1988.
147. Hibbs JB, Tainter RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity. Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235, 473-476, 1987.
148. Thomas G, Ramwell FW. Vasodilatory properties of mono-L-arginine-containing compounds. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 154, 332-338, 1988.
149. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, w druku.
150. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse

macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7738-7742, 1985.

151. Amezcua JL, Dusting GJ, Palmer RMJ, Moncada S. Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator. *Br. J. Pharmacol.* 95, 101-105, 1988.

152. Holzmann S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary artery strips. *J. Cyc. Nucl. Res.* 8, 409-419, 1982.

153. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ. Res.* 52, 353-357, 1983.

154. Ignarro LJ, Burke TM, Wood KS, Wolin MS, Kadovitz PJ. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228, 682-690, 1984.

155. Popescu LM, Poniou C, Hinescu M, Nutu O. The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 107, 393-394, 1985.

156. Adams AF, Haslam RJ. Factors affecting the activity of guanylate cyclase in lysates of human blood platelets. *Biochem. J.*

174, 28-35, 1978.

157. Haslam RJ. Roles of cyclic nucleotides in platelet function.

W: *Biochemistry and pharmacology of platelets*. Red. Knight J. Elsevier

1975, str. 121-157.

158. Chiang TM, Dixit SN, Kang AH. Effect of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate on human platelet function. *J. Lab. Clin. Med.* 88, 215-221, 1976.

159. Glass DB, Gerrard JM, Townsend D, Carr DW, White JG, Goldberg ND. The involvement of prostaglandin endoperoxide formation in the elevation of cyclic GMP levels during platelet aggregation. *J. Cyc. Nucl. Res.* 3, 37-44, 1977.

160. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorro EG, Hyman AL, Kadovitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'.5' monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57, 946-955, 1981.

161. Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* 88, 411-415, 1986.

162. Ryan VS, Mortera M, Whitaker C. Methods for microcarrier culture of bovine pulmonary artery endothelial cells avoiding the use of enzymes. *Tissue Cul.* 12, 619-635, 1980.

163. Davies PF. Microcarrier culture of vascular endothelial cells on solid plastic beads. *Exp. Cell Res.* 134, 367-376, 1981.

164. Gordon JL, Martin W. Stimulation of endothelial prostacyclin production plays no role in endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. *Br. J. Pharmacol.* 80, 179-186, 1983.

165. Cocks TM, Angus JA, Campbell JH, Campbell GR. Release and

- properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J. Cell Physiol.* 123, 310-320, 1985.
166. Sanford KK, Earle WR, Evans VJ. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Nat. Cancer Inst.* 11, 773-795, 1951.
167. Sinzinger H, Angelberger P, Hofer R. Platelet labeling with In^{111} -oxine-benefit of prostacyclin (PGI_2) addition for preparation and injection. *J. Nucl. Med.* 22, 292-295, 1981.
168. Paterson RA, Eagles PAM, Young DAB, Beddell CR. Rapid preparation of large quantities of human haemoglobin with low phosphate content by counter-flow dialysis. *Int. J. Biochem.* 7, 117-118, 1976.
169. Mant MJ. Platelet adherence to collagen: a simple, reproducible, quantitative method for its measurement. *Thromb. Res.* 11, 729-737, 1977.
170. Lapetina EG, Reep B, Read NG, Moncada S. Adhesion of human platelets to collagen in the presence of prostacyclin, indomethacin and compound BW 755C. *Thromb. Res.* 37, 325-335, 1986.
171. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 168, 178-195, 1963.
172. Salmon JA. A radioimmunoassay for δ -keto- $PGF_{1\alpha}$. *Prostaglandins* 13, 387-397, 1978.
173. Baumgartner HR, Studer A. Folgen des Gefäßkatheterismus am normo-und hypercholinesterinaemischen Kaninchen. *Path. Microbiol.* 29, 393, 1966.

174. Stemerman MB, Ross R. Experimental atherosclerosis. I. Fibrous plaque formation in primates an electron microscope study. *J. Exp. Med.* 136, 769-789, 1972.
175. Lister J. On the coagulation of blood. *Proc. Roy. Soc. (Lond.)* 12, 580-611, 1863.
176. Thackrah CT. An inquiry into the nature and properties of the blood, as existent in health and disease. Cox, London 1819.
177. Higgs EA, Moncada S, Vane JR, Caen JP, Michel H, Tobelem G. Effect of prostacyclin (PGI_2) on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins* 16, 17-22, 1978.
178. Czervionke RL, Smith JB, Fry GL, Hoak JC, Haycroft DL. Inhibition of prostacyclin by treatment of endothelium with aspirin. *J. Clin. Invest.* 63, 1089-1092, 1979.
179. Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin (prostaglandin I_2 , PGI_2) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 53, 244-250, 1979.
180. Dejana E, Cazenave JP, Groves HM, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF. The effect of aspirin inhibition of PGI_2 production on platelet adherence to normal and damaged rabbit aortae. *Thromb. Res.* 17, 453-464, 1980.
181. Curven KD, Gimbrone MA, Handin RI. In vitro studies of thromboresistance. The role of prostacyclin (PGI_2) in platelet adhesion to cultured normal and virally transformed human vascular endothelial cells. *Lab. Invest.* 42, 366-374, 1980.

182. Krishnamurthi S, Westwick J, Kakkar VV. Regulation of human platelet activation—analysis of cyclooxygenase and cyclic AMP dependent pathways. *Biochem. Pharmacol.* 33, 3025–3035, 1984.
183. Yamada KM, Olden K. Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275, 179–184, 1978.
184. Timpl R, Rohde H, Robey FG, Reinard SI, Foidort JM, Martin GR. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933–9937, 1979.
185. Moncada S. Agents which modify prostacyclin/thromboxane metabolism W: Pharmacological control of hyperlipidaemia. JR Prous Publish. SA 1986, str. 439–456.
186. Bunting S, Moncada S, Vane JR. Prostacyclin—thromboxane A_2 balance. *Br. Med. Bull.* 39, 271–276, 1983.
187. Świąć J, Radomski M, Gryglewski RJ. Angiotensin-induced release of prostacyclin (PGI_2) into circulation of anaesthetized cats. *Pharmacol. Res. Commun.* 11, 649–655, 1979.
188. Gryglewski RJ, Sławiński J, Korbut R. Endogenous mechanisms that regulate prostacyclin release. W: *Adv. Prostagl. Thromb. Res. Red.* Samuelsson B, Ramwell FW, Paoletti R. Raven Press, 1980, str. 777–787.
189. Nowak J, Radomski M, Kaijser L, Gryglewski RJ. Conversion of exogenous arachidonic acid to prostaglandins in the pulmonary circulation in vivo. A human and animal study. *Acta Physiol. Scand.* 112, 405–411, 1981.
190. Gryglewski RJ, Radomski M, Świąć J, Ocetkiewicz A. Release of

prostacyclin into the circulation by chemical mediators. W: Role of chemical mediators in the pathophysiology of acute illness and injury. Raven Press 1982, str. 253-262.

191. Świąc J, Radomski M, Dembińska-Kieć A, Korbut R, Gryglewski RJ. Stimulatory cholinergic effect on the release of antiaggregatory activity into the circulation of cat and man and its modification by beta-adrenergic antagonists. Eur. J. Clin. Invest. 15, 320-326, 1985.

192. Blair IA, Barrow SE, Waddell KA, Lewis PJ, Dollery CT. Prostacyclin is not a circulating hormone in man. Prostaglandins 23, 579-589, 1982

193. Schafer AI, Zavoico GB, Loscalzo J, Maas AK. Synergistic inhibition of platelet activation by plasmin and prostaglandin I₂. Blood 69, 1504-1507, 1987.

194. Mizuta T, Chika I. Tissue type plasminogen activator inhibits aggregation of platelets in vitro. Life Sci. 113, 955-963, 1988.

195. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Release of nitric oxide accounts for the antiplatelet activity of endothelium-derived relaxing factor (EDRF): Interactions with prostacyclin. Thromb. Res. Suppl VII, 8, 1987.

196. Grace GC, Dusting GJ, Kemp BE, Martin TJ. Endothelium and the vasodilator action of rat calcitonin gene-related peptide (CGRP). Br. J. Pharmacol. 91, 729-733, 1987.

197. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets. J. Clin. Invest. 48, 1073-1082, 1969.

198. Penington DG, Lee NLY, Roxburgh AE, McGready JR. Platelet density and size. The interpretation of heterogeneity. *Br. J. Haematol.* 34, 365-376, 1976.
199. Thompson CB, Eaton KA, Friniciotta SM, Ruskin CA, Valeri CR. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity and function. *Br. J. Haematol.* 50, 509-519, 1982.
200. Ratnoff OD. A new property of an old remedy: fibrinolysis and aspirin. *New. Eng. J. Med.* 296(10), 566-567, 1977.
201. Moroz LA. Increased blood fibrinolytic activity after aspirin ingestion. *New. Eng. J. Med.* 296(10), 525-529, 1977.
202. Hidaka H, Endo T. Selective inhibitors of three forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase—basic and potential clinical applications. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* vol. 16. Red. Strada SJ, Thompson WJ. Raven Press 1984, str. 245-259.
203. Weishaar RE, Burrows SD, Kobylarz DC, Quada MM, Evans DB. Multiple molecular forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase in cardiac and smooth muscle and in platelets. Isolation, characterization, and effects of various reference phosphodiesterase inhibitors and cardiotoxic agents. *Biochem. Pharmacol.* 35, 787-800, 1986.
204. Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor.

- J. Pharmacol. Exp. Ther. 237, 539-547, 1986.
205. Hagiwara M, Endo T, Kanayama T, Hidaka H. Effect of 1-(3-chloroanilo)-4-fenyloftalazyna (MY5445), a specific inhibitor of cyclic GMP phosphodiesterase, on human platelet aggregation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 228, 467-471, 1984.
206. Ruppert D, Weithmann KV. HL725, an extremely potent inhibitor of platelet phosphodiesterase and induced platelet aggregation in vitro. Life Sci. 31, 2037-2043, 1982.
207. Lugnier C, Schaeffter F, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. Biochem. Pharmacol. 35, 1743-1751, 1986.
208. Kawamoto S, Hidaka H. 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl piperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. Bioch. Biophys. Res. Commun. 125, 258-264, 1984.
209. Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase activity by endothelium-derived relaxant factor: A general principle of its vasodilator and antiaggregatory properties. Thromb. Res. Suppl. VII 03, 1987.
210. Haslam RJ, Salam SE, Fox JEB, Lynham JA, Davidson MML. Roles of cyclic nucleotides and of protein phosphorylation in the regulation of platelet function. W: Cellular response mechanism and their biological significance. Ed. Rotman A, Meyer FA, Gilter C, Silberberg A. Wiley & Sons Ltd 1980, str. 213-231.

211. Kawahara Y, Yamanishi J, Fukuzaki I. Inhibitory action of guanosine 3',5'-monophosphate on the thrombin-induced calcium mobilization in human platelets. *Thromb. Res.* 33, 203-209, 1984.
212. Henderson AH, Morgan RO, Newby AC. The inhibition by sodium nitroprusside of ADP-induced calcium influx and calcium mobilization in human platelets. *J. Physiol.* 387, 89P, 1987.
213. Takai Y, Kaibuchi K, Matsubara T, Nishizuka Y. Inhibitory action of guanosine 3',5'-monophosphate on thrombin-induced phosphatidylinositol turnover and protein phosphorylation in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 61-67, 1981.
214. Bohme E, Graf H, Schultz G. Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* vol. 9. Red George WN, Ignarro LJ. Raven Press 1978, str. 131-143.
215. Dembińska-Kieć A, Gryglewska T, Żmuda A, Gryglewski RJ. The generation of prostacyclin by arteries and by coronary vascular bed is reduced in experimental atherosclerosis in rabbit. *Prostaglandins* 14, 1025-1034, 1977.
216. Weiss SJ, Turk J, Needleman P. A mechanism for the hydroperoxide mediated inactivation of prostacyclin synthase. *Blood* 53, 1191-1196, 1979.
217. Fitzgerald GA, Smith B, Pederson AK, Brash AR. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *New Eng. J. Med.* 310,

1065-1068, 1984.

218. Förstermann V. Properties and mechanisms of production and action of endothelium-derived relaxing factor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8(10):545-551, 1986.

219. Henry PD, Bossaler C, Yamamoto H. Impaired endothelium-dependent relaxation and cGMP formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *Thromb. Res. Suppl.* VII, 06, 1987.

220. Shimokawa H, Tomoika H, Nabeyama Y. Coronary artery spasm induced in atherosclerotic miniature swine. *Science*. 221, 560-561, 1983.

221. Sreeharan N, Jayakody RL, Senaratne MPJ, Thomson ABR, Kappagoda CT. Endothelium-dependent relaxation and experimental atherosclerosis in the rabbit aorta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64, 1451-1453, 1986.

222. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zannenkeyn LL, Van Hove CE, Caene MC, Herman AG. Effect of hypercholesterolaemia on vascular reactivity in the rabbit: I. Endothelium-dependent and endothelium independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolaemic rabbits. *Circ. Res.* 58, 552-564, 1986.

223. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Van Hoydonck AE, Herman AG.

Experimental atherosclerosis reduces both the release and the vascular action of EDRF. *Thromb. Res. Suppl.* VII, 10, 1987.

224. Andrews HE, Bröckdorfer KR, Dunn RC, Jacobs M. Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit

aorta. *Nature* 327, 237-239, 1987.

225. Popławski A, Skorulska M, Niewiarowski S. Increased platelet adhesiveness in hypertensive cardiovascular disease. *J. Atheroscl. Res.* 8, 721-723, 1968.

226. Coccheri S, Fiorentini P. Platelet adhesiveness and aggregation in hypertensive patients. *Acta Med. Scand.* 525(supl.) 273-275, 1971.

227. Vlachakis ND, Aledort L. Hypertension and propranolol therapy: effect on blood pressure, plasma catecholamines and platelet aggregation. *AmJ. Cardiol.* 45, 321-325, 1980.

228. Valtier D, Guicheney F, Baudouin-Legnoux M, Meyer D. Platelets in human essential hypertension: in vitro hyperreactivity to thrombin. *J. Hypert.* 4, 551-555, 1986.

229. Winkvist RJ, Bunting PB, Barkin EP, Wallace AA. Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *J. Hypert.* 2, 541-545, 1984.

230. De Mey JG, Gray SD. Endothelium-dependent reactivity in resistance vessels. *Prog. Appl. Microcirc.* 8, 181-187, 1985.

231. Durante W, Sen AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 94, 463-468, 1988.

232. Lüscher TF, Diederich D, Liebenmann R, Lehmann K, Stulz P, von Segesse L, Yang Z, Tirina M, Grädel E, Weber E, Rohler F. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *New Eng. J. Med.* 319, 462-467, 1988.

233. Kanamaru K, Waga S, Kojima T, Fujimoto K, Niwa S. Endothelium-dependent relaxation of canine basilar arteries: II. Inhibition by hemoglobin and cerebrospinal fluid from patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Stroke* 18, 938-943, 1987.
234. Gryglewski RJ, Szczeklik A, McGiff JC-red. Prostacyclin, Clinical trials. Raven Press 1985.
235. Whittle BJR, Moncada S, Whiting F, Vane JR. Carbacyclin - a potent stable prostacyclin analogue for the inhibition of platelet aggregation. *Prostaglandins* 19, 605-627, 1980.
236. Schrör K, Darius H, Matzky R, Ohlendorf A. The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36374) - equipotent to PGI₂ in vitro. *Naun. Schm. Arch. Pharmacol.* 316, 232-235, 1981.
237. Kukovetz WR, Holzman S. Mechanism of nitrate-induced vasodilatation and tolerance. *Z. Kardiol.* 72, 14-19, 1983.
238. Lascialzo J. N-acetylcysteine potentiates inhibition of platelet aggregation by nitroglycerin. *J. Clin. Invest.* 76, 703-708, 1985.
239. Needleman P, Jakschik B, Johnson J. Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 324-331, 1973.
240. Horovitz JD, Antman EM, Lorell BH, Barry WH, Smith TW. Potentiation of the cardiovascular effects of nitroglycerin by N-acetylcysteine *Circulation* 68, 1247-1253, 1983.

241. Yanagisawa M, Kurikara H, Kimura S, Tonobe S, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415, 1988.
242. Radomski MW, Palmer RMJ, Read NG, Moncada S. Isolation and washing of human platelets with nitric oxide. *Thromb. Res.* 50, 537-546, 1988.
243. Blough NV, Zafiriou DC. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* 24, 3502-3504, 1985.
244. Trąbka-Janik E. Cytoprotekcyjne działanie stymulatorów guanylowej cyklazy na ludzkie leukocyty. *Folia Med. Cracov.* w druku.
245. Rimele TJ, Sturm RJ, Adams LM. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 102-111, 1988.
246. Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Clin. Res.* 35, 13-20, 1987.
247. Vanhoutte FM. The end of the quest?. *Nature* 327, 459-460, 1987.
248. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival). Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* ii, 349-360, 1988.

LEGENDY DO RYCIN

Ryc.1. Cykl metaboliczny PAF. Objasnienia w tekscie.

Ryc.2. Dwufazowe uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidow blon komorkowych. Objasnienia w tekscie.

Ryc.3. Metabolizm kwasu arachidonowego w plytkach krwi. Na rysunku zaznaczono rowniez szlak metaboliczny wiodacy do powstawania prostacykliny w sredbionku naczyniowym.

Ryc.4. Znaczenie Ca^{2+} w procesie aktywacji plytek.

$r[Ca^{2+}]_i$ - poziom w warunkach spoczynku;

$s[Ca^{2+}]_i$ - poziom w czasie aktywacji.

Ryc.5. Cykl fosfatydyloinozytolowy i powstawanie endogennych jonoforow w plytce. Objasnienia w tekscie.

Ryc.6. Rola ukladu cykazy adenylowej i cAMP w regulacji procesu aktywacji plytek. Objasnienia w tekscie.

Ryc.7. Hamowanie adhezji plytek do kolagenu III przez NO (●), PGI_2 (▶) oraz w obecnoSci obydwu inhibitorow (○); n=8.

Ryc.8. Potegowanie antyadhezyjnego dzialania NO (a) i PGI_2 (b) przez MB22948 i MYS445. HL725 nie wplywa na antyadhezyjne wlasnosci NO i PGI_2 . NO (●); PGI_2 (▶); inhibitor+MB22948 (○); inhibitor+MYS445 (○); inhibitor+HL725 (■); n=8.

Ryc.9a. Wplyw aspiryny (Asp), dysmutazy O_2^- (SOD), MB22948 (MB) i hemoglobiny (Hb) na hamujace adhezje plytek do EC dzialanie EDRF wydzielonego z 1.5ml EC przez bradykinine (100nM, Bk); n=8.

b. Wplyw NO, PGI_2 i ww. zwiazkow na adhezje plytek do ECM. C- kontrolna adhezja plytek do EC i ECM pobudzana trombina (3mU *

ml^{-1}); $n=6$.

Ryc.10. Porównanie adhezji płytek do EC przez egzogenny (▲) i endogenny (○) NO wydzielany przez bradykininę (30, 100 i 300nM); $n=3$.

Ryc.11. Krzywe uzyskane w czasie pomiaru agregacji w agregometrze świetlnym. Hamowanie agregacji płytek przez EDRF wydzielony z 1.5ml EC przez bradykininę (100nM, Bk) oraz osłabianie działania EDRF przez hemoglobinę (100nM, Bk+Hb) lub przez Fe^{2+} ($8\mu\text{M}$, Bk+ Fe^{2+}). C-agregacja kontrolna (U46619 1nM, U) w obecności inkubatu niestymulowanych komórek śródbłonna. Przedstawione wyniki są reprezentatywne dla 4 podobnych doświadczeń.

Ryc.12. Krzywe z agregometru świetlnego. Hamowanie agregacji płytek przez EDRF. a. Antyagregacyjne działanie EDRF zależy od ilości EC w czasie ich stymulacji przez bradykininę (100nM). Wartości liczbowe przy krzywych wskazują objętości (ml) EC użytych do inkubacji.

b. Antyagregacyjne działanie EDRF zależy od stężenia bradykininy (Bk) użytego do stymulacji EC. m

Wartości liczbowe przy krzywych wskazują stężenia Bk (nM) użyte do inkubacji. C-agregacja kontrolna (kolagen $4\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, coll) w obecności inkubatu niestymulowanych EC. Wyniki reprezentatywne dla 8 podobnych doświadczeń.

Ryc.13. Antyagregacyjne działanie EDRF zależy od czasu jego inkubacji z płytkami. Biologiczny $1/2 t$ na płytce (◆) jest przedłużany w obecności dysmutazy O_2^- (▶) lub MB22948 (■). EDRF

wydzielony z 1.5 ml EC przez bradykininę (100nM) dodawano do płytek na 15sek, 2 lub 4min przed kolagenem ($4\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$); n=4.

Ryc.14. Krzywe z agregometru świetlnego. Hamowanie agregacji płytek przez EDRF wydzielony z 1.5ml EC przez bradykininę (100nM, Bk) oraz potęgowanie działania EDRF przez MB22948 (MB) lub dysmutazę O_2^- (SOD). C-agregacja kontrolna (U46619 1nM, U) w obecności niestymulowanych komórek śródbłonna.

Wyniki reprezentatywne dla 4 podobnych doświadczeń.

Ryc.15. Antyagregacyjne działanie NO zależy od czasu jego inkubacji z płytkami. Biologiczny 1/2 t na płytki (●) jest przedłużany w obecności dysmutazy O_2^- (▶) lub MB22948 (■). NO ($0.45\mu\text{M}$) dodawano do płytek na 15 sek, 1, 2, 3 lub 4min przed kolagenem ($1\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$); n=6.

Ryc.16. Krzywe z agregometru świetlnego. Dysmutaza O_2^- (SOD) potęguje antyagregacyjne własności NO ($0.18\mu\text{M}$, SOD+NO), ale nie wpływa na antyagregacyjne własności PGI_2 (0.4nM , SOD+ PGI_2). SOD traci własności potęgujące po zagotowaniu (BSOD+NO). C-agregacja kontrolna wywołana kolagenem ($1\mu\text{g} * \text{ml}^{-1}$, coll). Wyniki reprezentatywne dla 6 podobnych doświadczeń.

Ryc.17. Krzywe z agregometru świetlnego. Wpływ inhibitorów esterazy dwufosforanowej na zahamowanie agregacji wywołane przez NO ($0.18\mu\text{M}$) lub PGI_2 (0.4nM). HL725 selektywnie spotęgował działanie PGI_2 (HL+ PGI_2 , HL+NO); MB22948 selektywnie spotęgował działanie NO (MB+NO, MB+ PGI_2); natomiast IBMX

nieselektywnie spotęgował działanie NO i PGI₂ (IBMX+NO, IBMX+PGI₂).
Zaden z ww. inhibitorów nie zahamował agregacji per se (HL, MB, IBMX). C-agregacja kontrolna (kolagen 1µg * ml⁻¹, coll). Wyniki reprezentatywne dla 6 podobnych doświadczeń.

Ryc.18.1. Krzywe z agregometru światlnego. Synergistyczne działanie endogennych PGI₂ i EDRF w hamowaniu agregacji płytek i jego zmniejszanie przez hemoglobinę (Hb) lub indometacynę (Indo).

a. Inkubaty (0.1ml) uzyskane w wyniku stymulacji komórek śródbłonna (SC) przy pomocy bradykininy (1,3 lub 10nM, Bk) zawierały odpowiednie ilości PGI₂ i NO (tabela 3), które zahamowały agregację płytek w sposób zależny od stężenia Bk (Bk 1, Bk 3, Bk 10).

b. W obecności hemoglobiny (Hb+SC) zaobserwowano osłabienie antyagregacyjnego działania Bk.

c. W obecności indometacyny (Indo+SC) dochodzi do zniesienia antyagregacyjnego działania Bk.

C-agregacja kontrolna (kolagen 4µg * ml⁻¹, coll) w obecności inkubatu niestymulowanych EC. Wyniki reprezentatywne dla 3-6 podobnych doświadczeń.

Ryc.18.2. Antyagregacyjne działanie EC zależy od stężenia bradykininy. (o) - hamowanie agregacji wywołane przez inkubaty stymulowanych komórek śródbłonna jest zmniejszane w obecności hemoglobiny (▶) lub indometacyny (◆); n=3-6.

Ryc.19. Krzywe z agregometru światlnego, Prostacyklina (PGI₂)

potęguje antyagregacyjne działanie egzogenne NO i EDRF. Podprogowe stężenia NO (100nM,a) oraz ilości EDRF uwolnione z 0.5ml EC przez bradykininę (100nM,b) były potęgowane przez podprogowe stężenie PGI₂ (0.1nM) (PGI₂+NO,PGI₂+EDRF). Hamowanie agregacji wywołane wspólnym działaniem podprogowych ilości EDRF lub NO było odwracane przez hemoglobinę (100nM,PGI₂+NO+Hb). C-agregacja kontrolna (kolagen 4μg * ml⁻¹,coll). Wyniki reprezentatywne dla 3-6 podobnych doświadczeń.

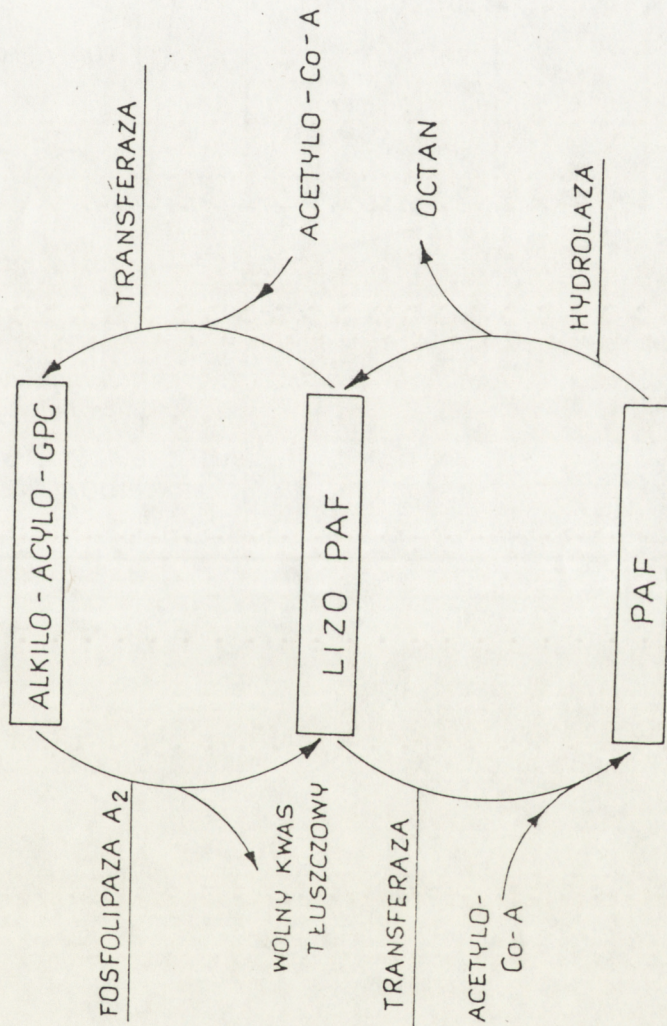
Ryc.20. Krzywe z agregometru świetlnego. Dezagregacyjne działanie egzogenne NO (a) lub EDRF (b) na agregację płytek. Wartości liczbowe umieszczone przy krzywych wskazują na : a. stężenia NO w uM, b. objętości EC użytych do inkubacji(ml), a stymulowanych przez bradykininę(100nM). C-agregacja kontrolna wywołana przez kolagen (1μg * ml⁻¹,coll) w obecności vehiculum (a) lub w obecności inkubatu niestymulowanych EC (b). Wyniki reprezentatywne dla 6 podobnych doświadczeń.

Ryc.21. Krzywe z agregometru świetlnego. Potęgowanie dezagregacyjnego działania egzogenne NO (0.1μM,a) lub EDRF (0.5ml EC,bradykinina 100nM,b) przez podprogowe ilości PGI₂, dysmutazy O₂⁻ (SOD) lub MB22948 (MB). C-agregacja kontrolna (kolagen 1μg * ml⁻¹,coll) w obecności vehiculum (a) lub inkubatu niestymulowanych EC (b).

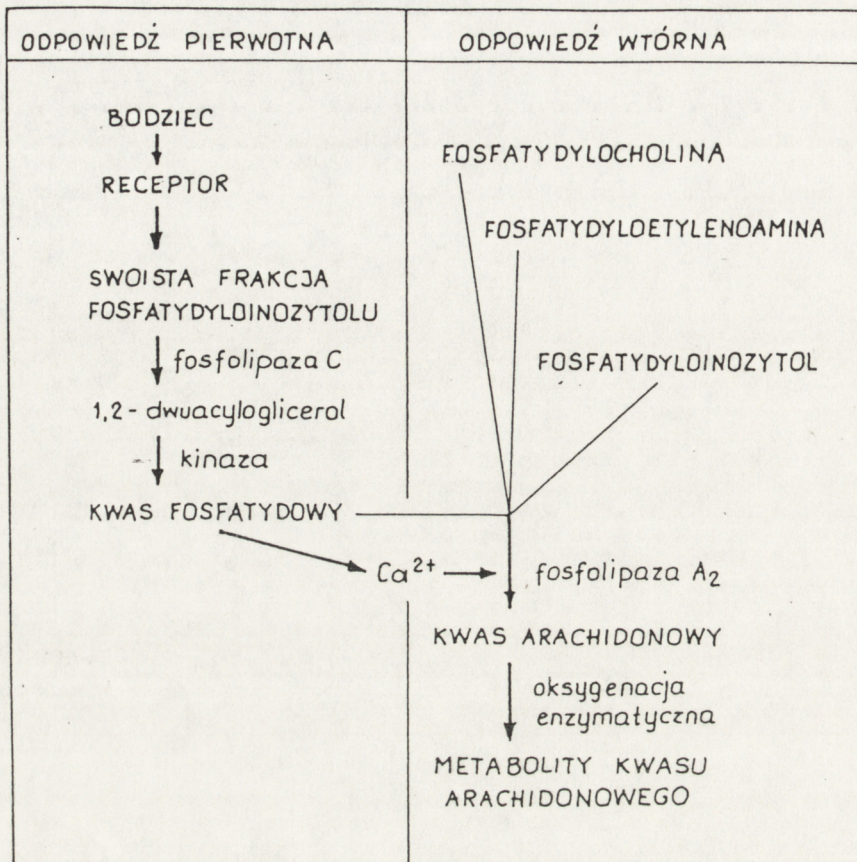
Ryc.22. Centralna rola Ca²⁺ w regulacji procesu aktywacji płytek. Hipoteza. Do podwyższenia [Ca²⁺]_i dochodzi w wyniku współdziałania

proagregacyjnych agonistów (adrenaliny-A, wazopresyny-V, trombiny-T i serotoniny-S) w procesie powstawania endogennych jonoforów (EI). Tlenek azotu (NO) i PGI₂ podwyższają poziom cyklicznych nukleotydów, których działanie prowadzi do obniżenia [Ca²⁺]_i.

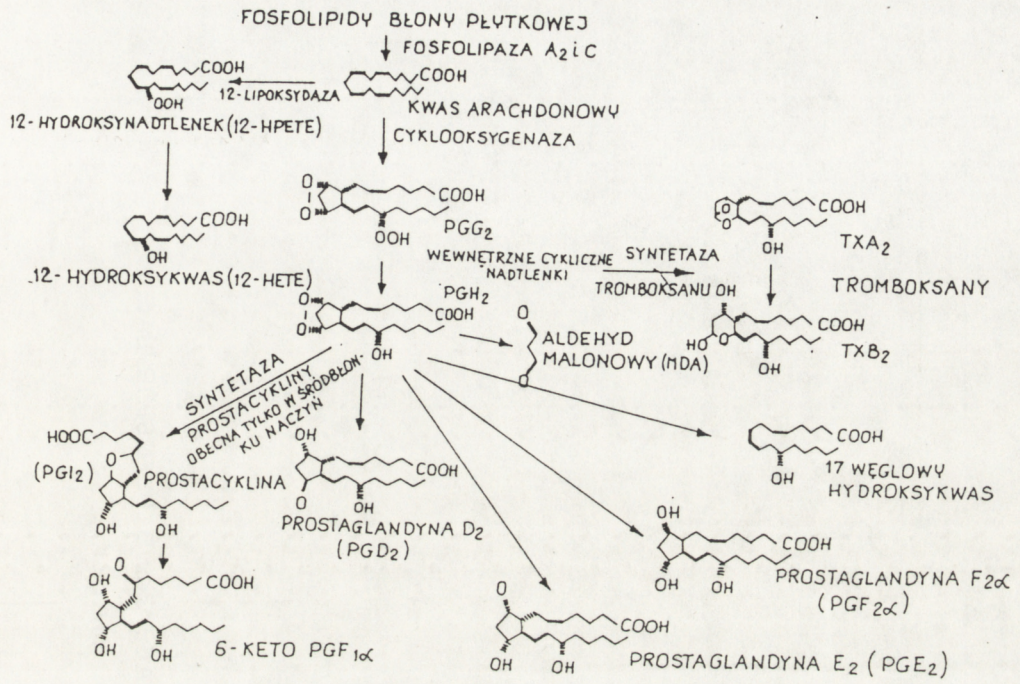
Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3



OSOCZE

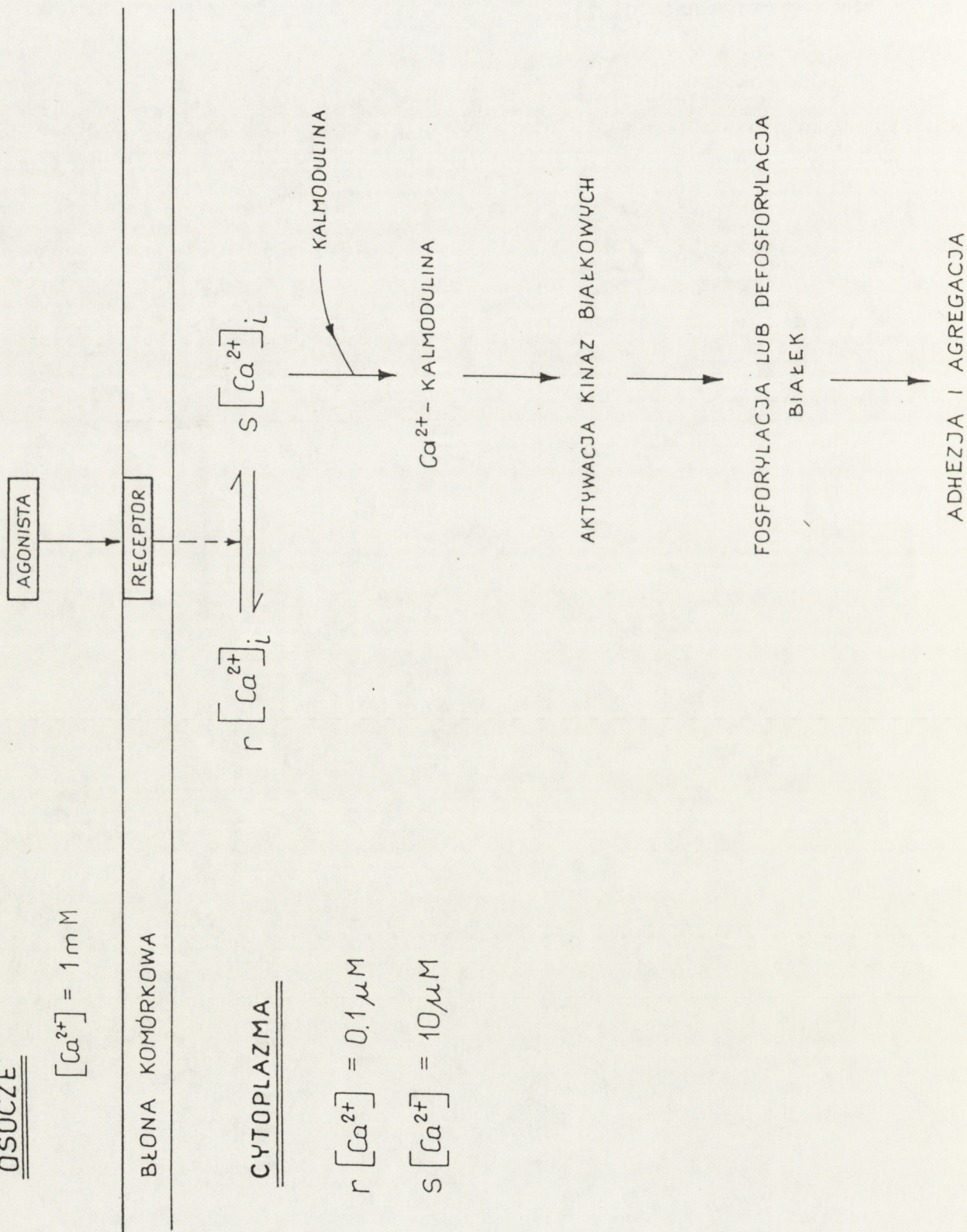
$$[Ca^{2+}] = 1 \text{ mM}$$

BŁONA KOMÓRKOWA

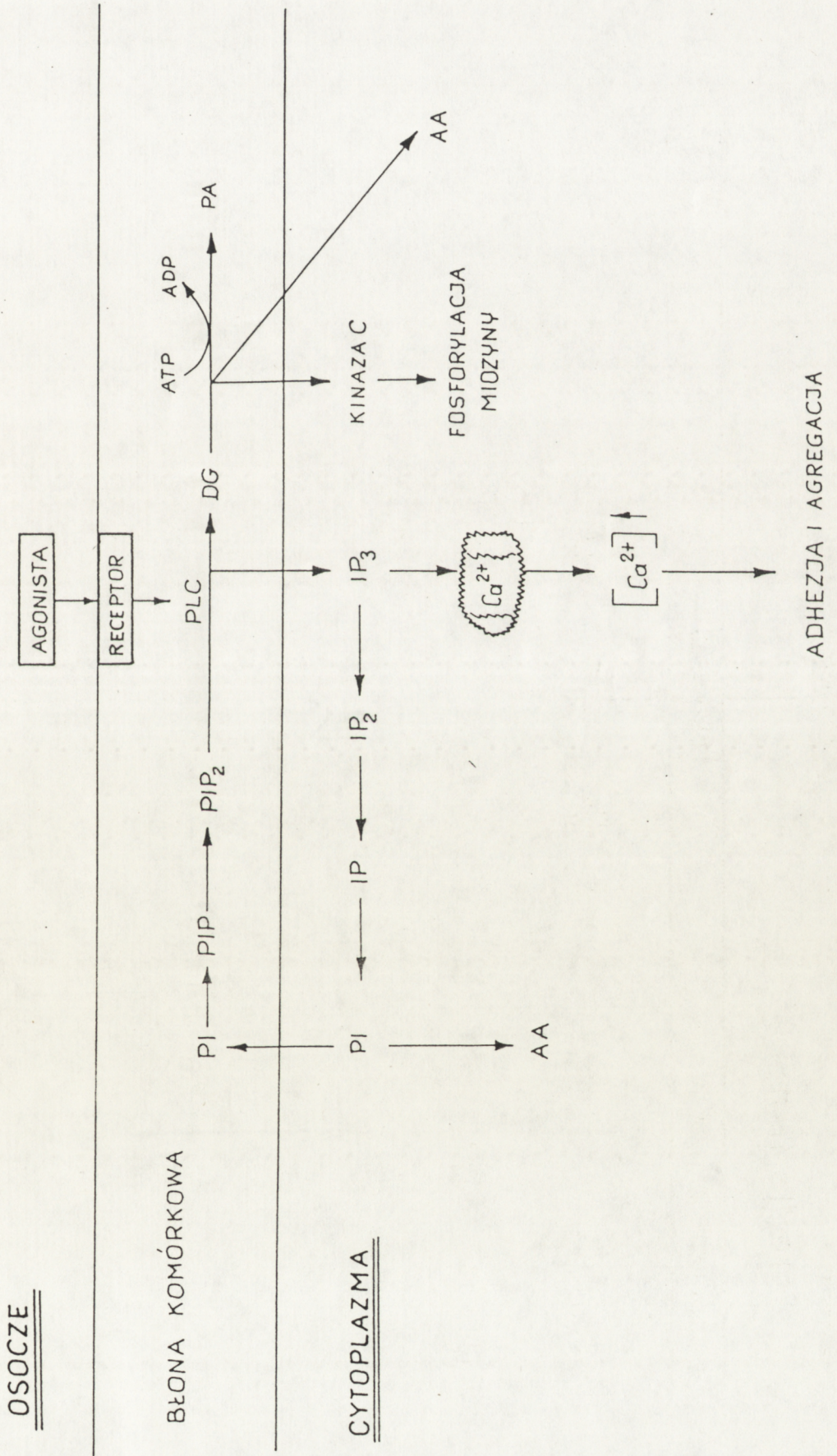
CYTOPLAZMA

$$r [Ca^{2+}] = 0.1 \mu\text{M}$$

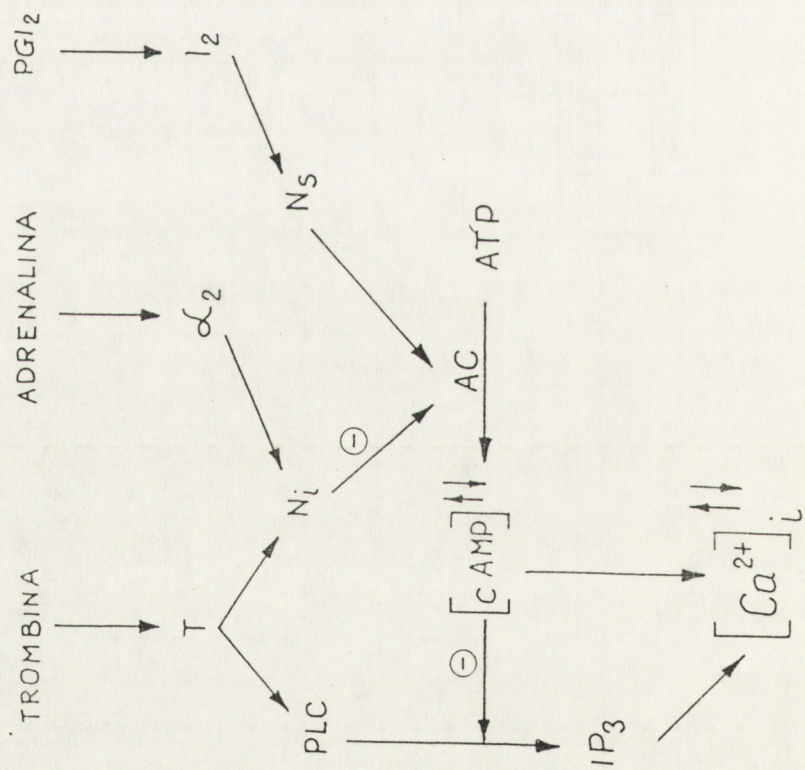
$$s [Ca^{2+}] = 10 \mu\text{M}$$



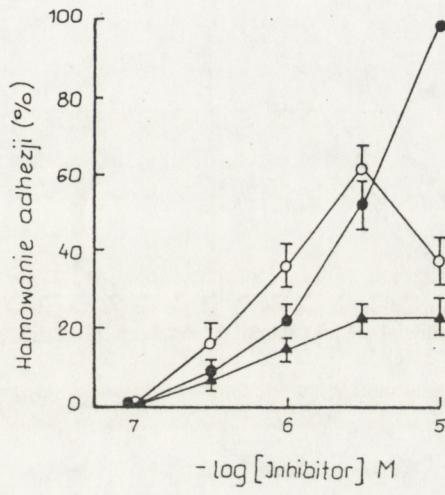
Ryc. 5



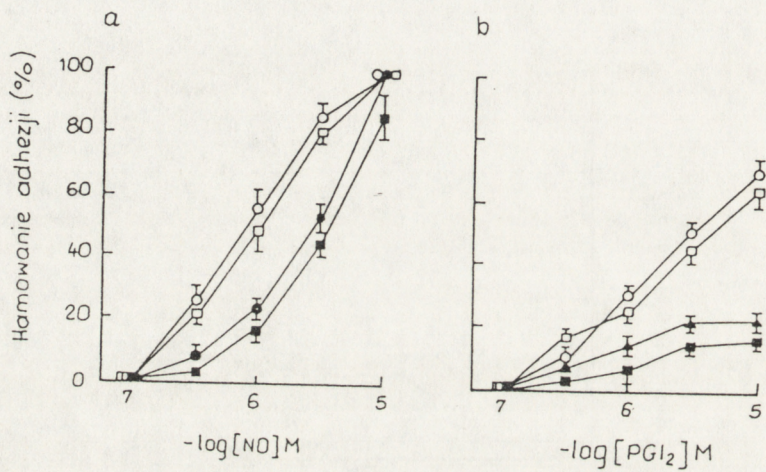
Ryc. 6



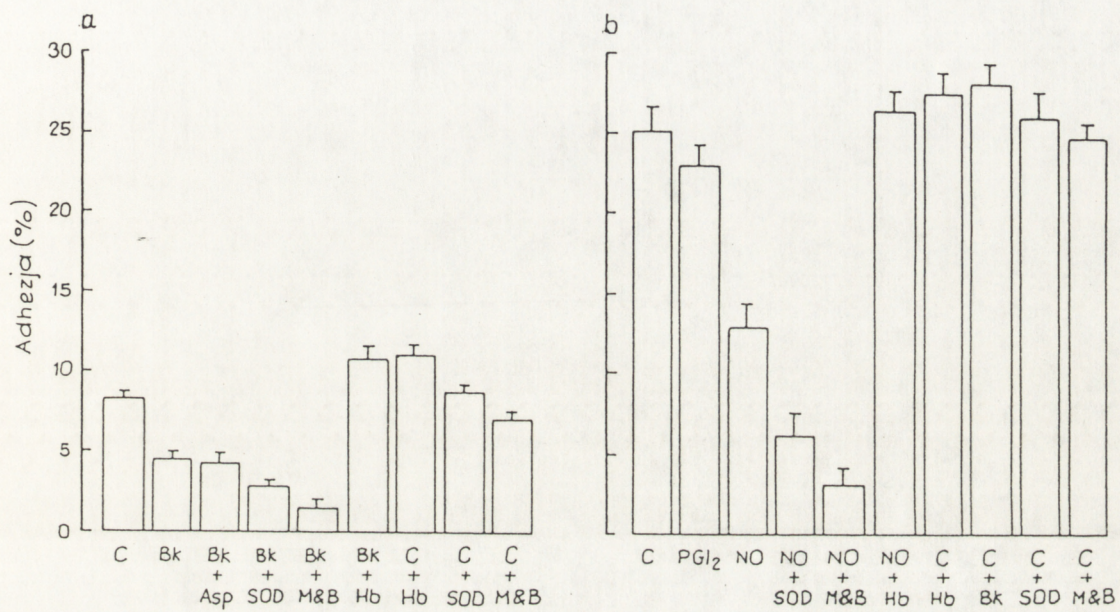
Ryc. 7



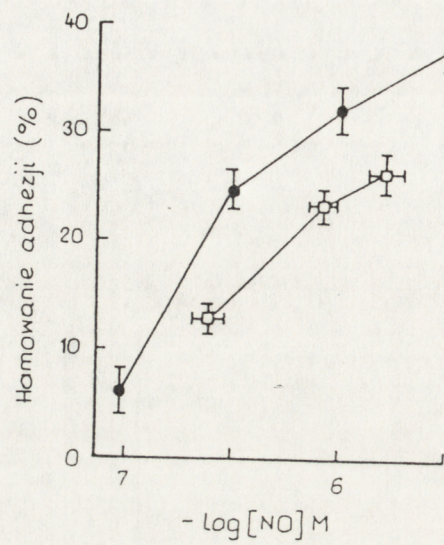
Ryc 8



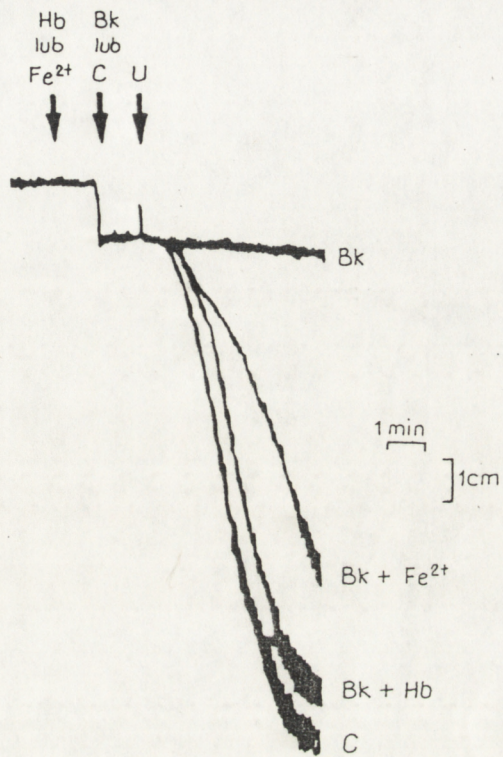
Ryc. 9



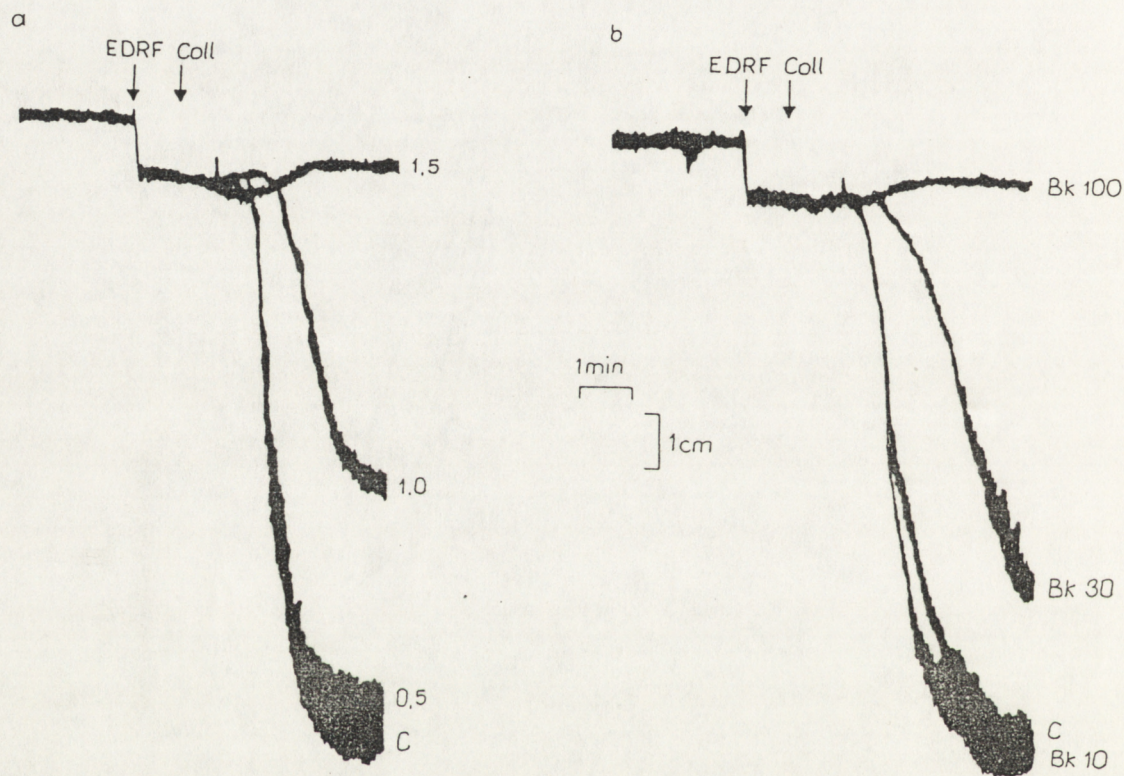
Ryc. 10



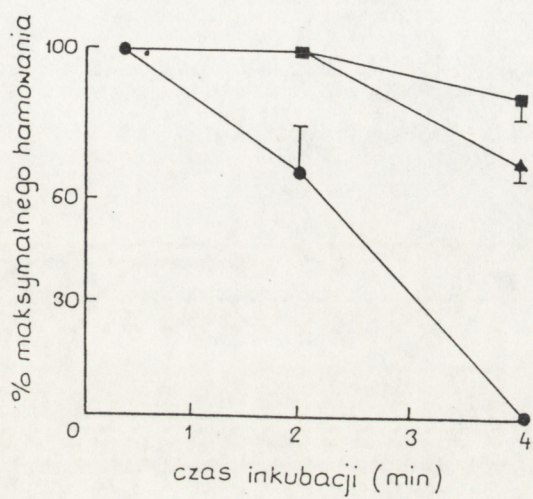
Ryc. 11



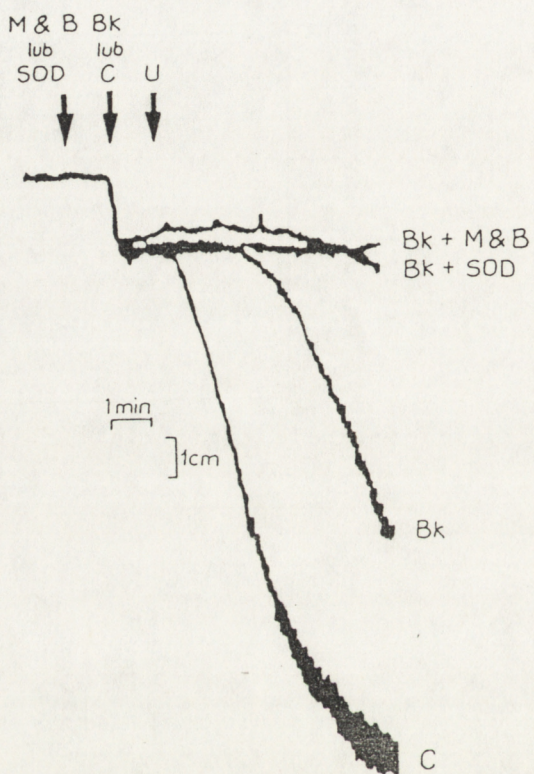
Ryc. 12



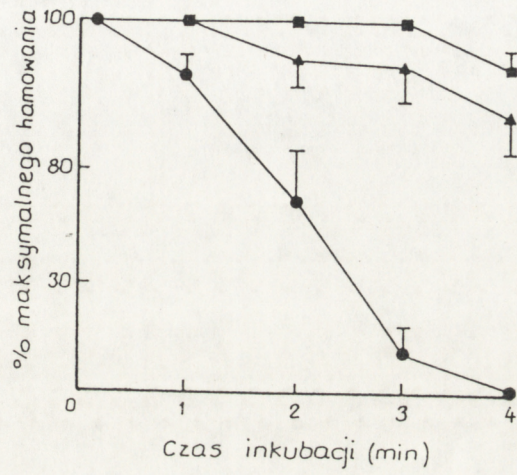
Ryc. 13



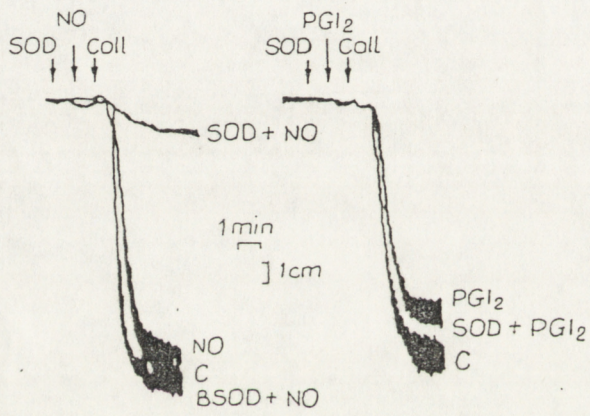
Ryc. 14

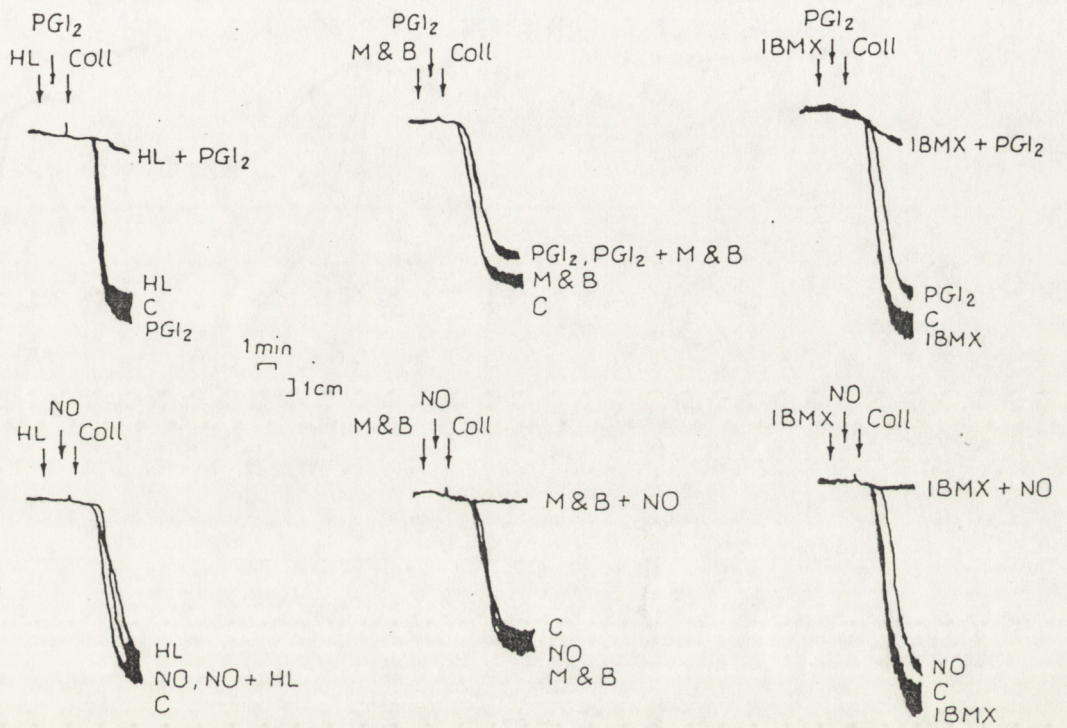


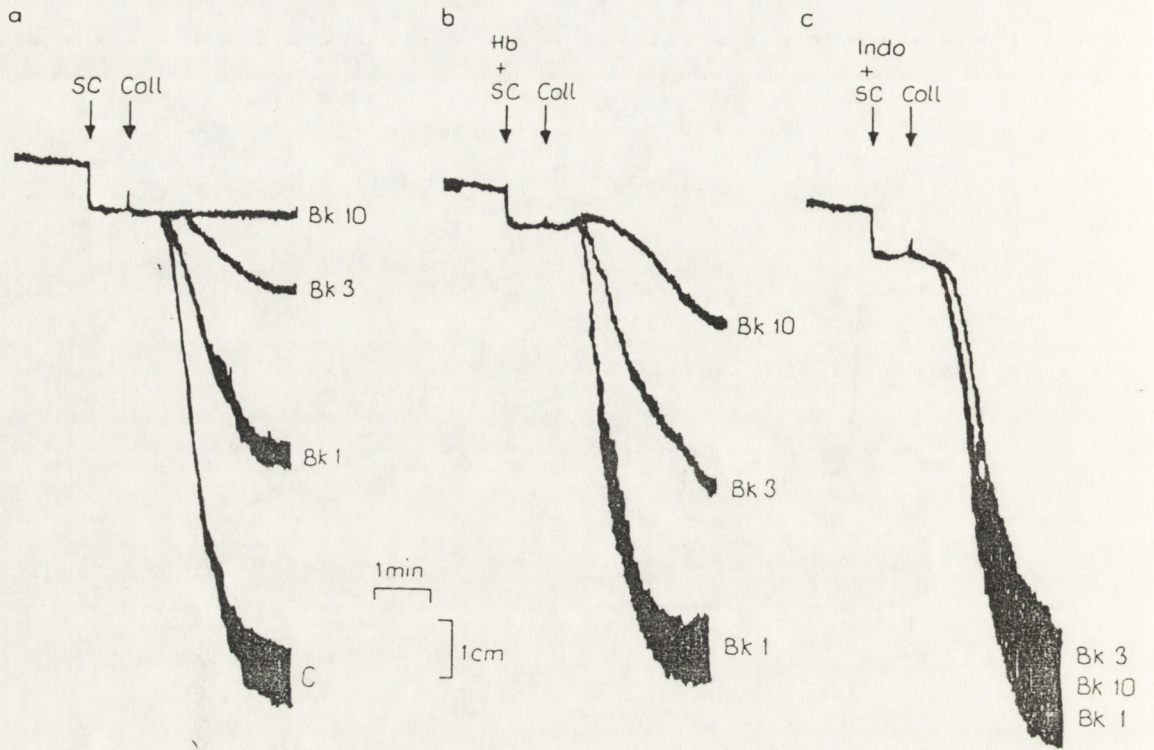
Ryc. 15



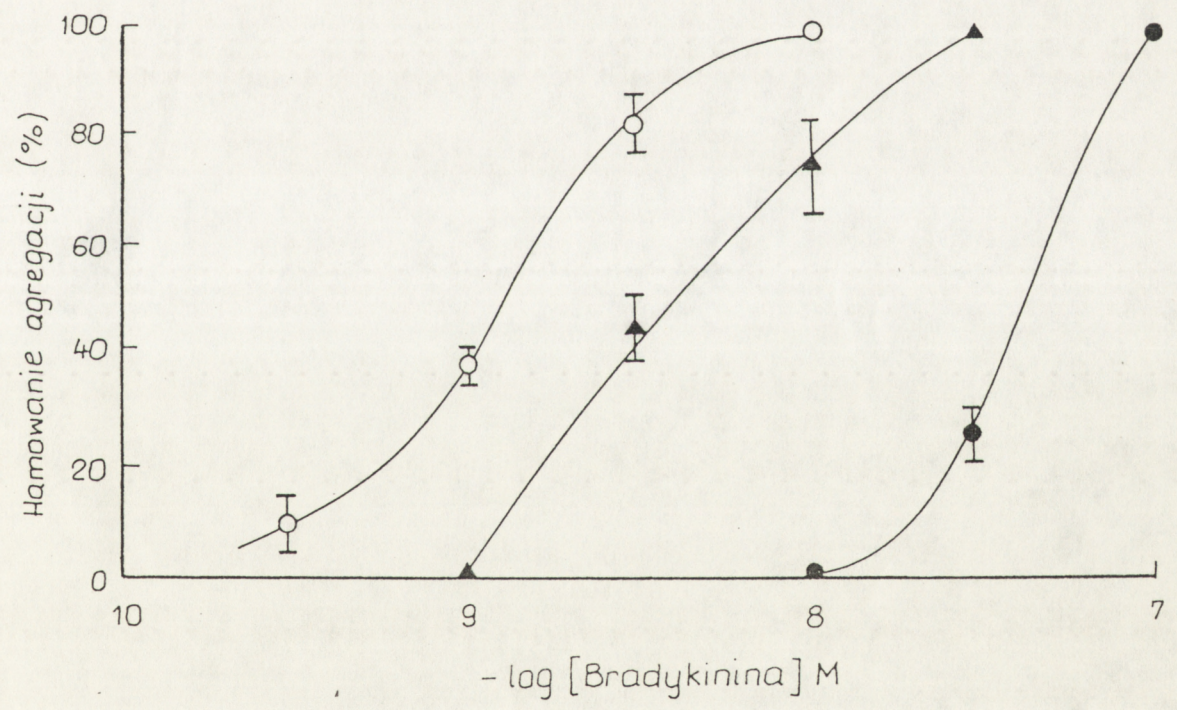
Ryc. 16

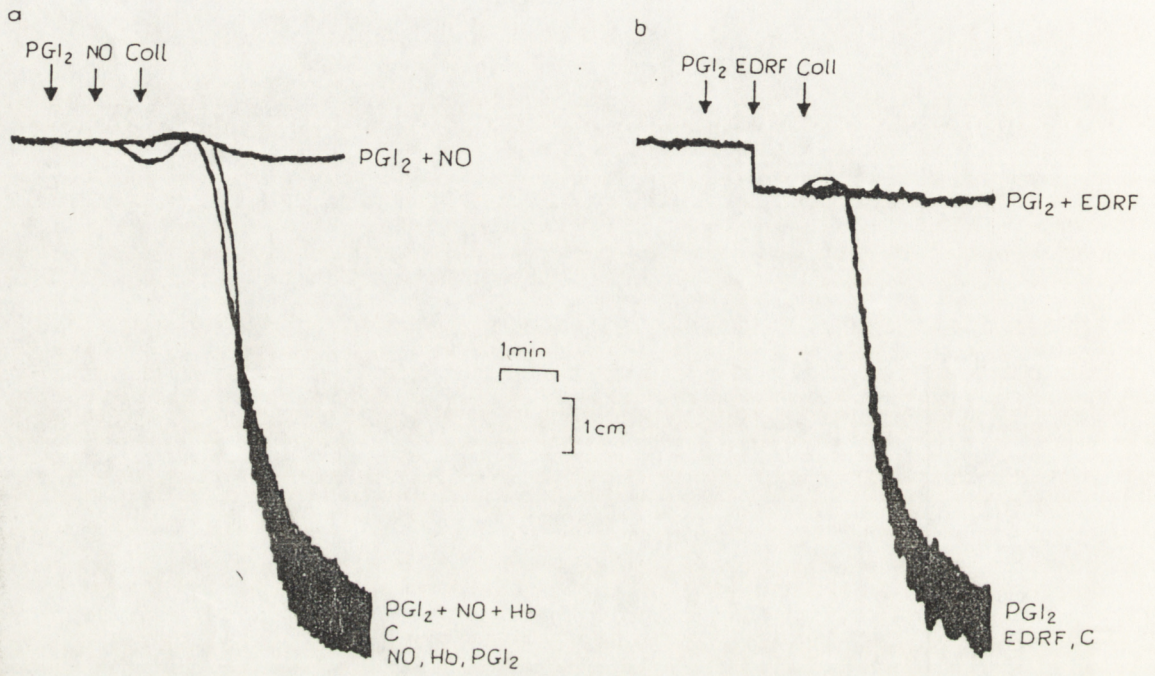




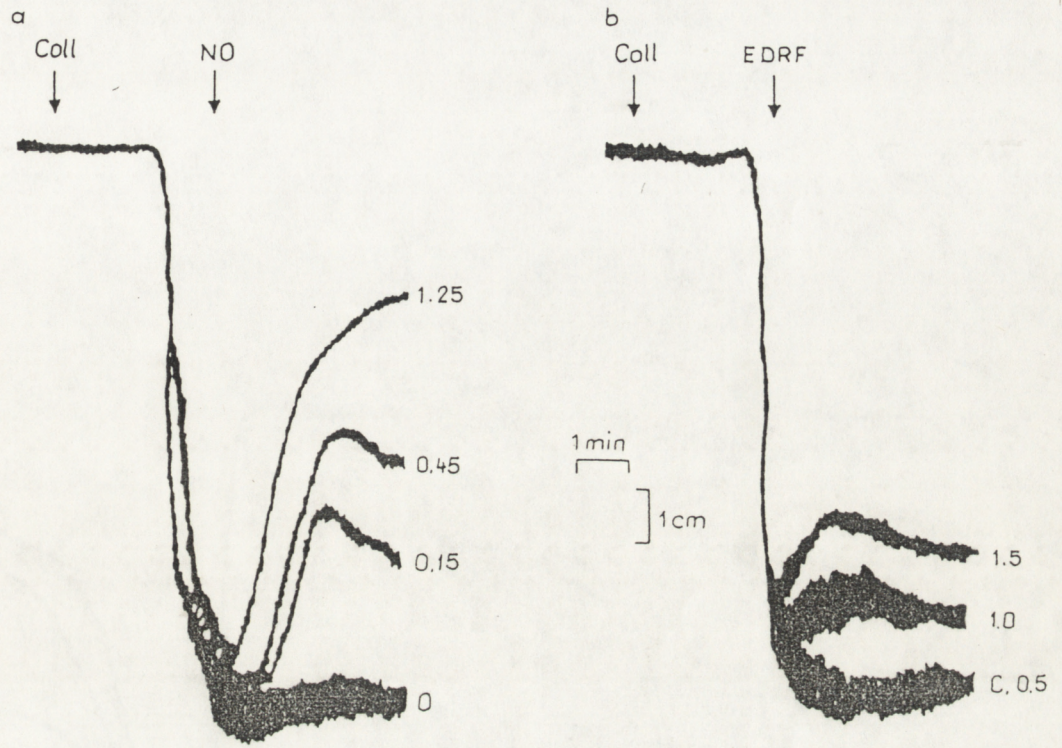


Ryc. 18.2

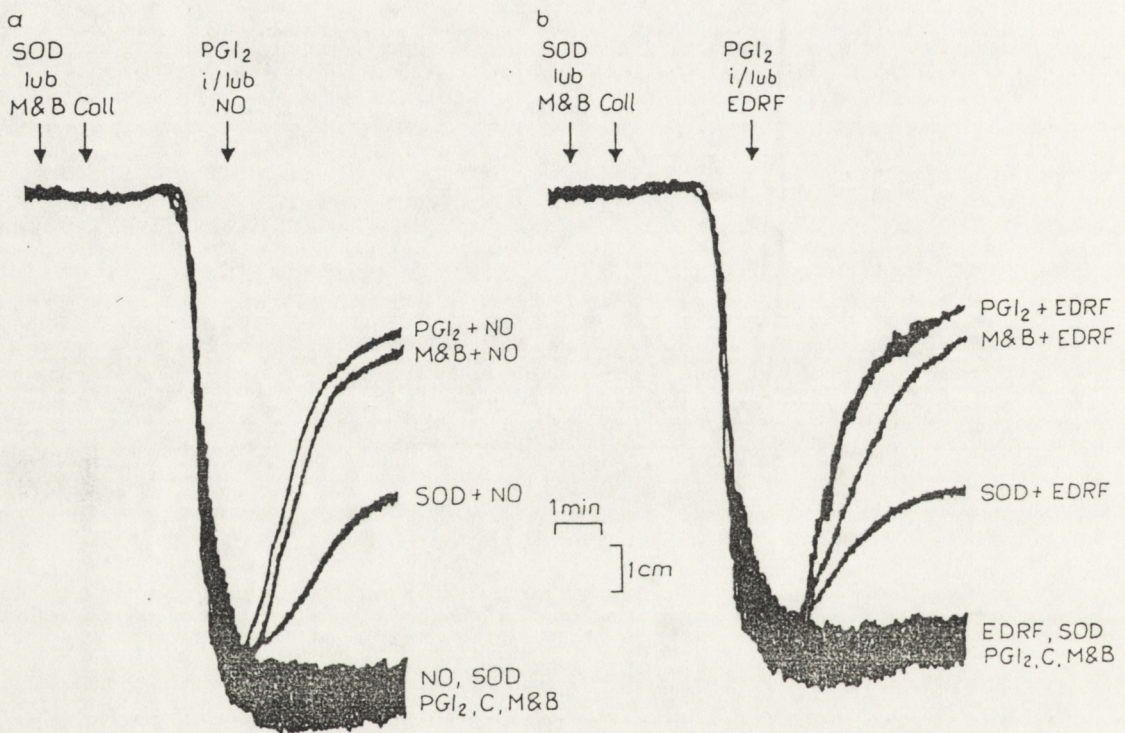


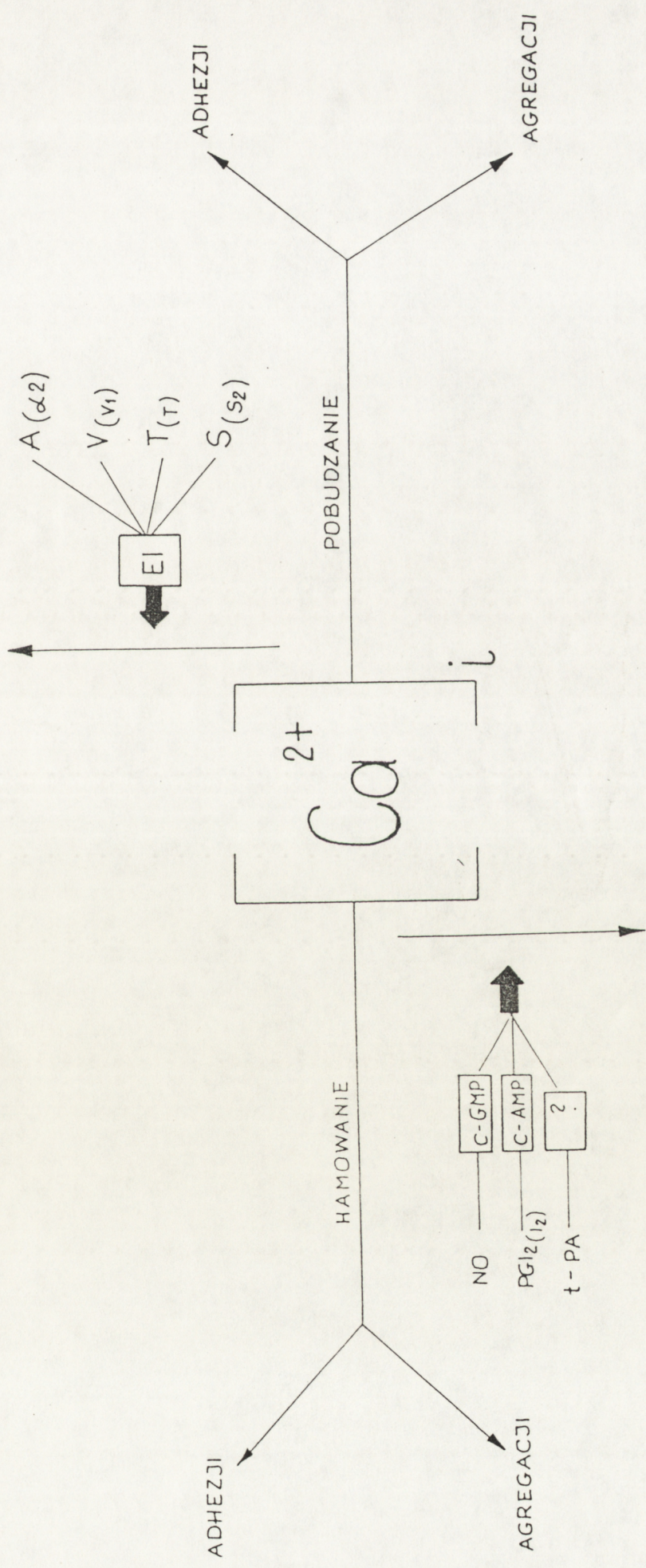


Ryc. 20



Ryc. 21





SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE

1. Przebieg adhezji i agregacji

2. Mechanizmy regulujące adhezję i agregację

2.1. Czynniki zwiększające adhezję i agregację

2.1.1. Siły tnące i krwinki czerwone

2.1.2. Krwinki białe

2.1.3. Białka i peptydy

2.1.3.1. Kolagen

2.1.3.2. Czynniki VIII/von Willebranda i glikoproteidy płytkowe

2.1.3.3. Fibrynogen

2.1.3.4. Trombina

2.1.3.5. Wazopresyna

2.1.4. ADF, serotonina i adrenalina

2.1.5. Pochodne fosfolipidów błon komórkowych

2.1.5.1. (1)-alkylo-2(R)-acetylo-glicerolo-3-fosforylocholina

2.1.5.2. Eikozanoidy

2.1.6. Synergizm w aktywacji płytek

2.1.7. Rola fosfolipazy C w procesie mobilizacji Ca^{2+} w płytce -
cykl fosfatydyloinozytolowy

2.2. Czynniki zmniejszające adhezję i agregację

2.2.1. Prostacyklina

2.2.1.1. Biosynteza

2.2.1.2. Własności chemiczne

2.2.1.3. Własności biologiczne

2.2.1.4. Mechanizm działania, układ cykazy adenylowej w płytce

2.2.2. Kwas 13-hydroksyoktadienowy

2.2.3. Śródbłonkowy czynnik rozszerzający (EDRF)

2.2.3.1. Odkrycie

2.2.3.2. Budowa chemiczna

2.2.3.3. Biosynteza i losy w ustroju

2.2.3.4. Mechanizm działania

3. Eksperymentalne przesłanki i cel pracy.

MATERIAŁY I METODY

1. Hodowla

1.1. Komórki śródbłonka (EC)

1.2. Macierz pozakomórkowa komórek śródbłonka (ECM)

2. Izolacja płytek z krwi ludzkiej i ich znakowanie ¹¹¹In

3. Odczynniki

4. Badanie adhezji

4.1. Adhezja płytek do kolagenu III,

4.2. Adhezja płytek do EC i ECM

5. Badanie agregacji

5.1. Hamowanie agregacji

5.1.1. Egzogenne NO i PGI₂

5.1.2. EDRF

5.1.3. Interakcja EDRF z endogenną PGI₂

5.2. Pobudzanie dezagregacji

5.3. Ocena stopnia zahamowania agregacji i pobudzenia
dezagregacji

6. Oznaczanie EDRF, NO i PGI₂ w inkubatach EC

7. Statystyczne opracowanie wyników

WYNIKI

1. Adhezja płytek do kolagenu III

1.1. Hamowanie adhezji przez NO i PGI₂

1.2. Interakcja NO z PGI₂

2. Adhezja płytek do ECM i EC

2.1. Hamowanie adhezji płytek do ECM przez egzogeny NO

2.2. Hamowanie adhezji płytek do EC przez egzogeny NO

2.3. Hamowanie adhezji płytek do EC przez EDRF

2.4. Uwalnianie NO i PGI₂ z EC

3. Antyagregacyjne własności EC

3.1. Działanie EDRF

3.1.1. EDRF jako inhibitor agregacji płytek

3.1.2. Zmniejszanie działania EDRF przez Hb i jony Fe²⁺

3.1.3. Potęgowanie działania EDRF przez dysmutazę O₂⁻ (SOD) i

MB22948

3.2. Działanie NO i PGI₂

3.2.1. Hamowanie agregacji przez NO i PGI₂

3.2.2. Zmniejszanie działania NO przez Hb lub jony Fe²⁺

3.2.3. Potęgowanie działania NO przez SOD

3.2.4. Modułacja hamującego działania NO i PGI₂ przez MB22948

IBMX i HL725

3.3. Synergizm antyagregacyjny NO z PGI₂

3.3.1. Wydzielnicze własności EC

3.3.2. Potęgowanie antyagregacyjnego działania EDRF, NO i PGI₂

4. Dezagregacyjne własności EC

4.1. Działanie EDRF, NO i PGI₂

4.2. Potęgowanie w dezagregacyjnym działaniu EDRF, NO i PGI₂

DYSKUSJA

1. Rola EDRF w hamowaniu aktywacji płytek

1.1. Adhezja

1.1.1. Prostacyklina nie jest endogennym inhibitorem adhezji

1.1.2. Hamowanie adhezji płytek przez EDRF i NO

1.2. Agregacja

1.2.1. Hamowanie agregacji i pobudzanie dezagregacji płytek
przez EDRF

1.2.2. Porównanie anty i dezagregacyjnych własności NO z PGI₂

2. Komórki śródbłonna uwalniają NO, który odpowiada za
antyadhezyjne i zmniejszające agregację działanie EDRF

3. Hipoteza synergistycznego hamowania procesu aktywacji płytek
krwi

3.1. Koncepcja pojedynczego inhibitora - kontrowersja PGI₂

3.2. Koncepcja synergistycznego działania kilku inhibitorów

3.2.1. Synergizm w hamowaniu agregacji i pobudzaniu
dezagregacji płytek

3.2.2. Synergizm w hamowaniu adhezji : NO i?

3.2.3. Znaczenie synergistycznego hamowania procesu aktywacji

płytek

4. Rola cyklazy guanylowej w procesach hamowania adhezji i agregacji płytek

4.1. Rola układu cyklazy guanylowej w hamowaniu adhezji

4.2. Rola układów : cyklazy guanylowej i cyklazy adenylowej w zmniejszaniu agregacji

4.3. Cykliczny GMP uruchamia mechanizmy obniżające $[Ca^{2+}]_i$

5. EDRF, prostacyklina a choroba naczyniowo-zakrzepowa

6. Terapeutyczne znaczenie NO i PGI₂

7. Perspektywy i kierunki badań

7.1. Poszukiwanie nowych regulatorów procesu aktywacji płytek krwi

7.2. Inne działania EDRF

7.2.1. Działanie cytoprotekcyjne

7.3. Synergizm farmakologiczny a poszukiwanie skuteczniejszych leków przeciwplatekcyjnych

PISMIENNICTWO

LEGENDY DO RYCIN

RYCINY