

Znaczenie adrenaliny w mechanizmie aktywacji ludzkich płytek krwi

The importance of adrenaline in the mechanism of activation of human platelets

Article history:
Received: 21.10.2018
Accepted: 10.06.2019

Agata Gołaszewska*

Zakład Chemii Fizycznej,
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Zakrzepy i zatory stanowią obecnie główną bezpośrednią przyczynę zgonów u hospitalizowanych pacjentów w krajach rozwiniętych. Szczególnie istotną rolę w procesie krzepnięcia, jak również w stanach patologicznej nadkrzepliwości, odgrywają płytki krwi. Jednym z fizjologicznych aktywatorów płytek krwi o stosunkowo mało poznanym mechanizmie działania jest adrenalina (epinefryna). Co istotne, warunki predysponujące do pojawienia się we krwi podwyższonego stężenia adrenaliny korelują ze zwiększonym ryzykiem epizodów zakrzepowych. Ludzkie płytki krwi posiadają w swej błonie plazmatycznej receptory α_2 -adrenergiczne i w warunkach *in vitro* wykazują agregację i sekrecję w odpowiedzi na mikromolowe stężenia adrenaliny. Użyte w przeprowadzanych dotychczas badaniach stężenia adrenaliny były co najmniej o rząd wielkości wyższe niż te, które stwierdzano w osoczu ludzkim. Rozbieżność ta wynika prawdopodobnie z faktu, że rola adrenaliny jako stymulatora płytek krwi *in vivo* polega najprawdopodobniej na działaniu potencjalizującym (synergizm z innymi aktywatorami płytek), a nie na działaniu adrenaliny jako aktywatora płytek *per se*. Wysiłki zmierzające do poznania mechanizmu działania adrenaliny na płytki krwi skupiają się głównie na wyjaśnieniu procesów zachodzących podczas przekazania sygnału poprzez receptory płytkowe. Dokładne przeanalizowanie każdego z etapów potencjalnego mechanizmu oddziaływania adrenaliny na ludzkie płytki krwi pozwoli na lepsze jego zrozumienie i zastosowanie tej wiedzy w tworzeniu nowych algorytmów leczenia pacjentów z zaburzeniami procesu hemostazy.

Abstract

Blood clots and embolism are now the main direct cause of death in hospitalized patients in developed countries. The platelets play an important role in the clotting process as well as in conditions of pathological hypercoagulability. One of the physiological platelet activators with a poorly known mechanism is adrenaline. Conditions predisposing to the appearance of elevated levels of adrenaline in the blood correlate with an increased risk of thrombotic events. Human platelets have α_2 -adrenergic receptors in their plasma membrane and show aggregation and secretion in response to micromolar adrenaline concentrations *in vitro*. The concentrations used in the studies were higher than those found in human plasma. This discrepancy probably results from the fact that the role of adrenaline as a platelet stimulator *in vivo* is based on potentiating effects and not on the action of adrenaline as an activator *per se*. Efforts aiming to understand the mechanism of action of adrenaline on platelets focuses mainly on the explanation of processes that occur during signal transduction through platelet receptors. An analysis of each stage of the potential mechanism of adrenaline impact on human platelets will allow for its better understanding and creation of new algorithms for treating patients with impaired haemostasis.

© 2019 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Insitute of Hematology and Transfusion Medicine. Published by Sciendo. All rights reserved.

Słowa kluczowe:

płytki krwi, adrenalina, hemostaza, epinefryna, synergizm

Keywords:

platelets, adrenaline, haemostasis, epinephrine, synergism

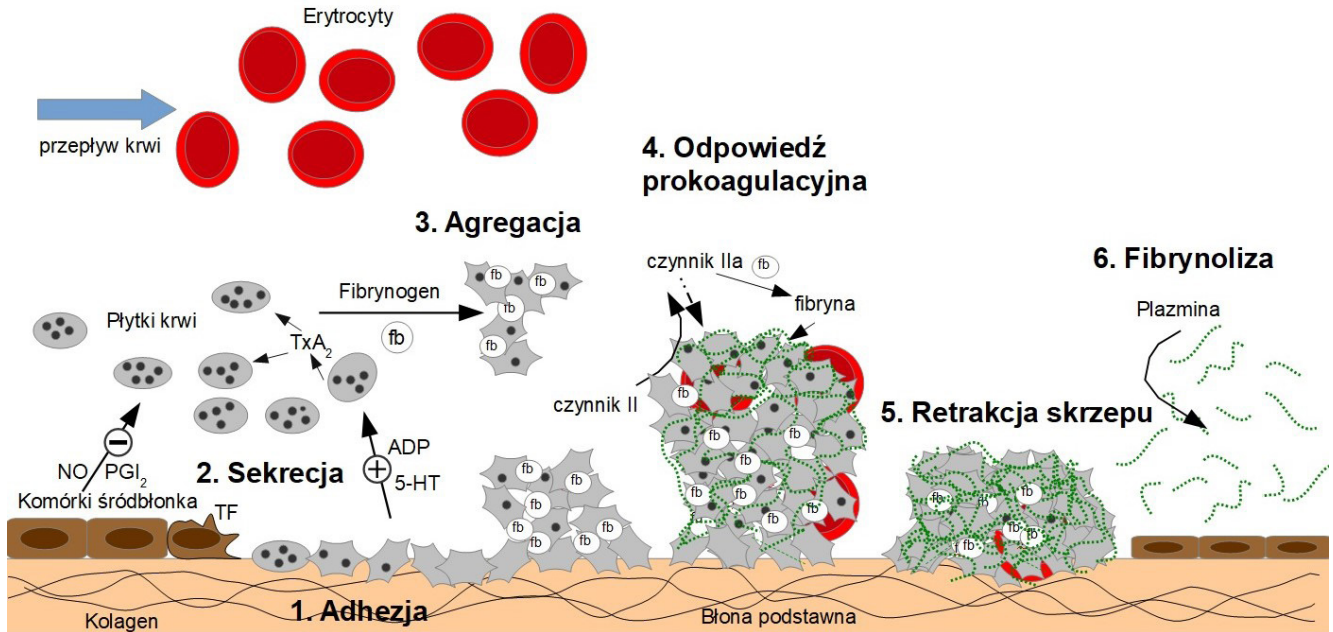
Funkcje płytek krwi

Płytki krwi (trombocyty) są najmniejszymi, wysoce wyspecjalizowanymi elementami morfotycznymi krwi [1]. Podstawową ich rolą jest udział w prawidłowym przepływie krwi w naczyniach (funkcja hemostatyczna) i utrzymaniu ogólnej homeostazy organizmu. W przypadku przerwania ciągłości śródbłonna naczynia krwionośnego płytki krwi są aktywowane jako pierwsze komórki i szczyt swoich właściwości proagregacyjnych osiągają już po około 30 sekundach. Aktywacja płytek krwi jest wieloetapowym procesem, który zależy od warunków biochemicznych i mechanicznych ich środowiska. Po aktywacji płytki krwi różnicują się na dwie subpopulacje, wykazujące proagregacyjny bądź prokoagulacyjny fenotyp [2]. Odmienne cechy tych subpopulacji rzutują na spełniane funkcje w procesie hemostazy. Pierwsza z wyróżnianych subpopulacji charakteryzuje się kompleksowymi zmianami morfologicznymi, aktywacją receptorów integrynowych i niską ekspozycją fosfatydyloseryny lub jej brakiem na

powierzchni zewnętrznej monowarstwy błony plazmatycznej płytki. Te proagregacyjne płytki są odpowiedzialne za utrzymanie odpowiedniej struktury skrzepu oraz jego obkurczanie. Druga z subpopulacji nazywana jest prokoagulacyjną, ponieważ błona plazmatyczna tych płytek pełni funkcję powierzchni katalitycznej, na której dochodzi do amplifikacji generacji trombiny, co w rezultacie prowadzi do depozycji fibryny wzmacniającej strukturę skrzepu. Prokoagulacyjne płytki krwi posiadają kulisty kształt, cechują się zaburzoną strukturą cytoszkieletu, niską aktywnością integryn oraz wysokim poziomem ekspresji fosfatydyloseryny na ich powierzchni, co sprzyja wiązaniu czynników krzepnięcia, zaś to prowadzi do znacznego przyspieszenia generacji trombiny (przyspieszenie reakcji krzepnięcia krwi). Patofizjologiczna rola prokoagulacyjnych płytek krwi i związany z ich aktywnością stan nadkrzepliwości pozostają nadal nieustalone [3].

Uwolnione podczas sekrecji płytkowej substancje mogą oddziaływać na inne płytki krwi (aktywując je) oraz na monocyty, limfocyty i neutrofile (działając jako chemoatraktanty). Związki te mogą

* Corresponding author: Agata Gołaszewska, Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Kilińskiego 1, 15-089 Białystok, Polska, email: gołaszewska.ag@gmail.com



Ryc. 1. Etapy hemostazy z udziałem płytek krwi
Fig. 1. Stages of haemostasis with platelets contribution

Przerwanie ciągłości naczynia krwionośnego prowadzi do odsłonięcia białek macierzy podścieliskowej, takich jak kolagen, oraz ekspresji czynnika tkankowego (TF), co aktywuje płytki krwi i inicjuje proces adhezji (1). Zaktywowane płytki, tworzące cienką monowarstwę komórek w miejscu uszkodzenia naczynia, wydzielają w procesie sekrecji substancje aktywujące kolejne płytki krwi z prądu krwi (2), w których dochodzi do generacji wtórnych aktywatorów np. TxA₂. Tak zaktywowane płytki ulegają agregacji łącząc się poprzez cząsteczki fibrynogenu (fb) (3). Tworzący się skrzep płytkowy jest następnie stabilizowany przez włókna fibryny, powstające w wyniku ograniczonej proteolizy fibrynogenu przez trombinę – enzym którego aktywacja ma miejsce na powierzchni zaktywowanych płytek krwi w wyniku wytworzenia aktywności prokoagulacyjnej (4). Następnie, powstały zakrzep fibrynowo-płytkowy ulega obkurczeniu za pośrednictwem siły kurczliwej generowanej przez płytki krwi (5). Ostatnim etapem odpowiedzi hemostatycznej jest proteolityczna degradacja fibryny przez układ fibrynolityczny po zakończeniu naprawy uszkodzonego naczynia (6).

zwiększać przepuszczalność naczyń krwionośnych oraz modulować napięcie mięśni gładkich naczyń, przyczyniając się do ich skurczu bądź rozluźnienia. Ziarnistości płytkowe zawierają bardzo liczne bioaktywne molekuly, posiadające działanie proagregacyjne i prozakrzepowe, m.in.: ADP, serotoninę, jony wapnia, czynnik von Willebranda czy fibrynogen. W granulach znajdziemy również białka regulujące proces powstawania i późniejszej lizy skrzepu, m.in.: czynnik krzepnięcia V, antytrombinę, inhibitor aktywatora plazminogenu (*plasminogen activator inhibitor-1* – PAI-1) czy inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (*tissue factor pathway inhibitor* – TFPI) [4]. Pobudzenie trombocytów może zająć dzięki obecności na ich powierzchni specyficznych receptorów oraz białek adhezyjnych. Kluczową rolę w agregacji płytek (a zatem w tworzeniu czopu płytkowego w naczyniu) pełni receptor GPIIb/IIIa, będący integralną płytkową umożliwiającą wiązanie się płytek krwi ze sobą poprzez mostki GPIIb/IIIa (na jednej płytce) – fibrynogen-GPIIb/IIIa (na drugiej płytce). Kolejną ważną cechą trombocytów jest uwalnianie mikropęcherzyków, które transportowane są razem z krwią po całym organizmie [5]. Są one fragmentami błony płytek krwi o silnie prokoagulacyjnych właściwościach, dzięki obecności na powierzchni takich molekuł jak: selektyna P, fosfatydylseryna czy glikoproteina IIb/IIIa, oraz są zrzucane (*shedding*) z aktywowanych płytek [6]. Pojawianie się mikropęcherzyków w krwiobiegu może

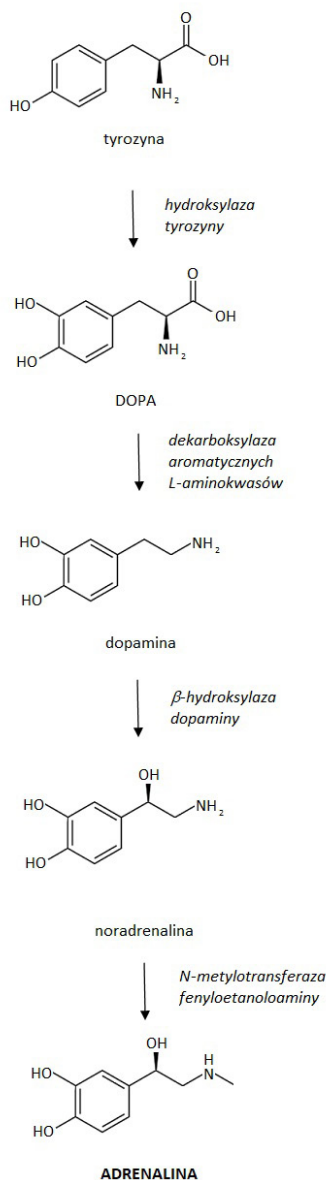
towarzyszyć wielu stanom patologicznym, między innymi cukrzycy [7], chorobie wieńcowej [8], anemii aplastycznej lub nocnej napadowej hemoglobinurii [9], a także może mieć miejsce po angioplastyce [10]. Ponadto, struktury te mają wpływ na genetykę „związanej z reakcjami zapalnymi arteriosklerozy” [11].

Rola adrenaliny w aktywacji płytek krwi

Płytki krwi odgrywają istotną rolę w epizodach zatorowo-zakrzepowych, jednej z najczęstszych bezpośrednich przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Obserwacje kliniczne oraz prace eksperymentalne wskazują na – dotychczas słabo poznaną – rolę adrenaliny w rozwoju stanów hiperreaktywności płytek krwi.

Adrenalina jest jedną z amin katecholowych, pochodnych fenylalaniny. Szlak syntezy adrenaliny przedstawia rycina 2. Po zsyntetyzowaniu trafia ona do krwiobiegu lub jest magazynowana w komórkach rdzenia nadnerczy bądź pęcherzykach wydzielniczych zakończeń nerwowych [12]. Jej stężenie w osoczu, według dostępnych danych, plasuje się poniżej 1 nmola/l, może jednak znacząco wzrastać w przebiegu różnych stanów chorobowych, jak również podczas stresu [13, 14]. Warto podkreślić przy tym fakt, że adrenalina jest agonistą płytkowym. Spowodowane jest to obecnością na ich powierzchni specyficznych receptorów adrenergicznych (typu α₂),

należących do rodziny receptorów związanych z białkiem G_2 , będącym jedną z odmian białka G_i [15]. Adrenalina może być efektywnie wychwytywana i magazynowana (oraz metabolizowana) przez płytki krwi. Wychwytywanie adrenaliny przez płytki w warunkach *in vitro* zachodzi na zasadzie transportu aktywnego [16]. Rola adrenaliny ulegającej sekrecji oraz potencjalna rola jej metabolitów w procesie aktywacji płytki nie została dotychczas poznana.



Ryc. 2. Schemat syntezy katecholamin
Fig. 2. Scheme of catecholamines synthesis

Niniejsza praca podsumowuje dotychczasowe badania nad wpływem adrenaliny na aktywację płytek krwi oraz nad synergizmem działania tej aminy katecholowej z innymi agonistami płytkowymi. Podsumowane zostały również kliniczne aspekty wykorzystania adrenaliny w terapii hematologicznej.

Znaczenie receptorów sprzężonych z białkiem G w przekazywaniu sygnału wywołanego adrenaliną w płytkach krwi

Dokładniejsze poznanie mechanizmu działania adrenaliny na płytki krwi skupia się głównie na wyjaśnieniu procesów zachodzących podczas przekazywania sygnału poprzez receptory płytkowe. W błonie plazmatycznej płytek krwi znajdują się receptory α_2 -adrenergiczne (szacunkowo na powierzchni jednej płytki krwi występuje 740 kopii receptorów α_{2A} -adrenergicznych) należące do rodziny białkowych receptorów sprzężonych z białkiem G (*G protein-coupled receptors* – GPCR) [17, 18]. Wszystkie receptory należące do rodziny GPCR mają wspólną strukturę siedmiu transbłonowych domen z pozakomórkowym N-końcem oraz wewnątrzkomórkowym C-końcem [19]. Nazwa receptorów wynika z ich związania z heterotrimericznymi białkami G, które są obecne w obszarze trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej, a każde z tych białek składa się z podjednostek α , β i γ . Poszczególne białka G klasyfikowane są do 4 rodzin, które wyróżnia się na podstawie różnorodności w budowie i funkcji podjednostki α . Dotychczas wyróżniono i opisano następujące rodziny białek G: G_s , G_i , G_q oraz $G_{12/13}$ [20]. O szczególnym znaczeniu GPCR w hemostazie świadczy to, iż receptory te oraz ich agonistów uznano za kluczowe cele terapii przeciwplatekowej ukierunkowanej na zmniejszenie powikłań zakrzepowych u pacjentów z ryzykiem nawrotu zawału serca i udaru mózgu [21].

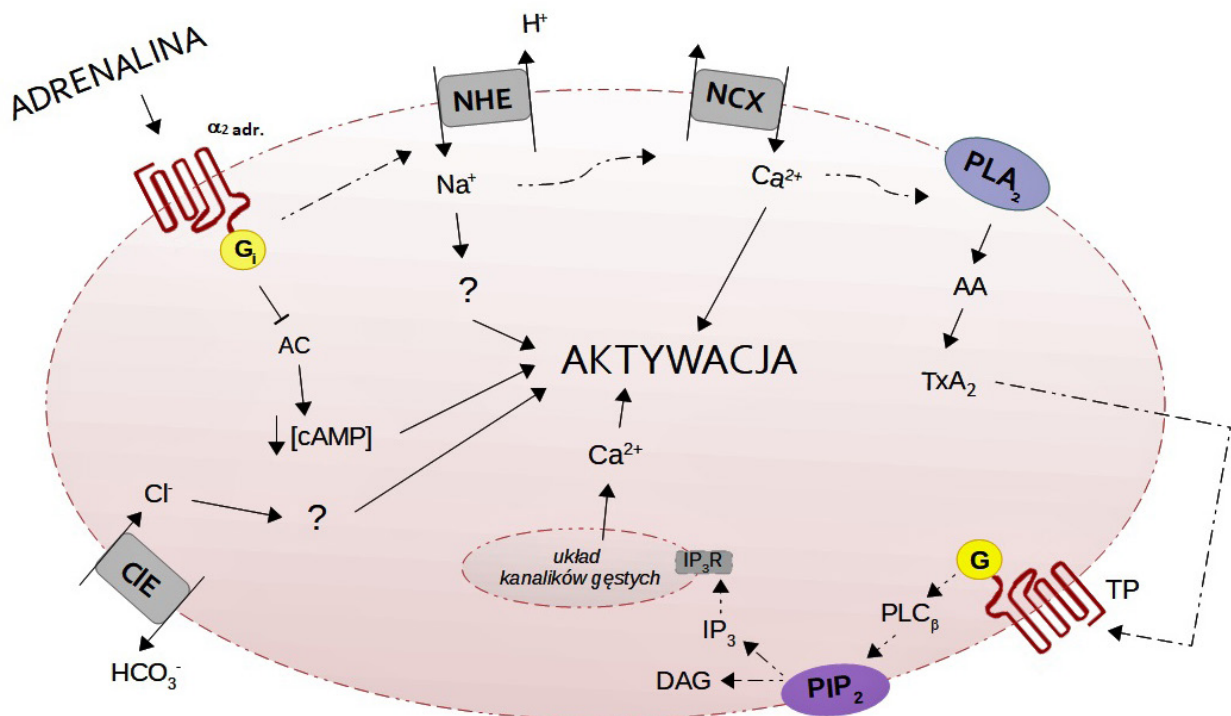
Efekty działania adrenaliny na receptory α_2 -adrenergiczne płytek krwi

Jednym z ligandów receptora α_2 -adrenergicznego jest adrenalina, a jego stymulacja w warunkach *in vitro* wywołuje efekt proagregacyjny [22]. Efekt ten osiągalny jest w warunkach eksperymentalnych przy zastosowaniu wielokrotnie wyższych stężeń adrenaliny od fizjologicznie występujących w organizmie człowieka. Agregacja płytek indukowana wyłącznie adrenaliną jest możliwa tylko przy mikromolowych jej stężeniach, podczas gdy fizjologicznie występujące stężenia adrenaliny w organizmie ludzkim to mniej niż 1 nmol/l do kilku nmol/l w sytuacji stresowej [14]. Konieczność stosowania w badaniach *in vitro* stężeń o kilka rzędów wielkości wyższych niż te stwierdzone w osoczu ludzkim może wynikać z tego, iż rola adrenaliny jako aktywatora płytek *in vivo* polega najprawdopodobniej na synergizmie z innymi aktywatorami płytek, nie zaś na działaniu tego hormonu jako stymulatora płytek *per se* [23]. Adrenalina, w stężeniach fizjologicznych oraz suprafizjologicznych, nasila działanie innych agonistów płytkowych, co przekłada się na nasiloną agregację, sekrecję, wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} i wiązanie fibrynogenu do płytek krwi [24]. Co interesujące, pomimo tego, że adrenalina (1-100 μ M) wywołuje agregację ludzkich płytek krwi zawieszonych w osoczu bogatopłytkowym (*platelet rich plasma* – PRP), to po izolacji tych komórek i ich ponownym zawieszeniu w środowisku sztucznym (płytki płukane – *washed platelets*) zawierającym jony wapnia, nie obserwuje się agregacyjnego działania tej aminy [25]. Pomimo tego, że w porównaniu z silnymi aktywatorami płytek, jak trombina czy kolagen, adrenalina jest określana jako słaby agonista płytek krwi, to wykazano, iż upośledzony proces agregacji indukowany

adrenaliną oraz zredukowana liczba receptorów katecholaminowych na powierzchni płytek krwi ma związek z występowaniem łagodnych skaz krwotocznych [15, 26-28]. W badaniach przeprowadzonych z udziałem pacjentów z wrodzonym deficytem receptorów α_2 -adrenergicznych na powierzchni płytek krwi zaobserwowano upośledzenie agregacji płytek przy minimalnym wpływie tego deficytu na aktywność cykazy adenylanowej. Sugeruje to istnienie innych niż cykaza adenylanowa wewnątrzpłytkowych efektorów zaangażowanych w proces agregacji indukowany adrenaliną [27]. Adrenalina, wiążąc się z receptorem α_2 -adrenergicznym sprzężonym z białkiem G_2 , (należącym do rodziny białek G), obecnym w błonie plazmatycznej płytki krwi powoduje zahamowanie tworzenia cAMP (cyklicznego adenosynomonofosforanu) poprzez blokowanie aktywności cykazy adenylanowej. Zmniejszenie stężenia cyklicznego adenosynomonofosforanu (*cyclic adenosine monophosphate* – cAMP) wewnątrz płytki sprzyja procesom aktywującym i to jemu przypisywana jest zdolność adrenaliny do potencjalizacji działania pozostałych agonistów płytkowych. cAMP wykazuje szereg hamujących efektów na proces aktywacji płytek, głównie poprzez aktywację szlaku zależnego od kinazy białkowej A (PKA) [15, 27]. Białko G_2 jest odpowiedzialne również za zdolność adrenaliny do aktywowania białka Rap1B, które odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji płytkowych receptorów GPIIb/IIIa, niezbędnych do zajścia agregacji płytek [15, 29].

Ponadto, pod wpływem działania adrenaliny na płytki krwi dochodzi do sekrecji – uwalniania aktywnych hemostatycznie substancji zmagazynowanych w płytkowych ziarnistościach gęstych ((serotonina (*5-hydroxytryptamine* – 5-HT), adenosynotrifosforan (*adenosine triphosphate* – ATP), adenosynodifosforan (*adenosine diphosphate* – ADP), Ca^{2+} , Mg^{2+})) [30]. Nierozstrzygnięta natomiast pozostaje kwestia tego, czy sekrecję płytkową wywołuje sygnał płynący bezpośrednio od receptora adrenergicznego, czy też potrzebna jest jednoczesna aktywacja innego receptora, np. receptora TP aktywowanego przez tromboksan A_2 , którego synteza jest uruchamiana przez adrenalinę [25].

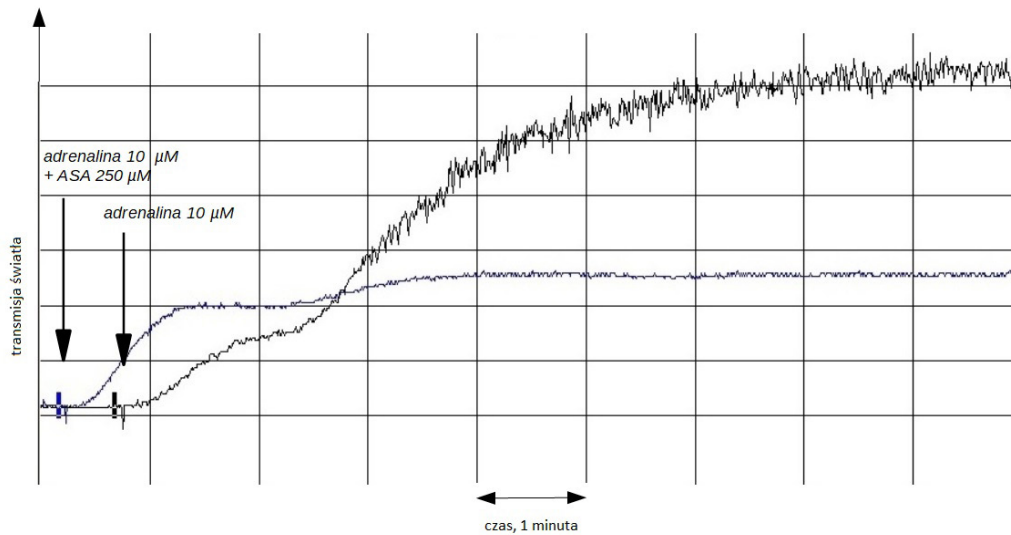
W analizowanym podczas wielu badań przebiegu procesu agregacji wywołanej adrenaliną zauważono, iż nieobecna jest w nim wyraźnie zaznaczona faza zmiany kształtu, tzw. *shape change* płytki, co odróżnia adrenalinę od większości poznanych dotąd aktywatorów płytek krwi. Nie zaobserwowano również bezpośredniej aktywacji fosfolipazy C (PLC) przez adrenalinę – kluczowego enzymu odpowiadającego za wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, niezbędnego do aktywacji płytki krwi. Adrenalina indukuje jednak tworzenie tromboksanu A_2 (TxA_2), który jest silnym aktywatorem PLC [31]. Obraz przeprowadzanej agregacji w warunkach *in vitro* przedstawia jej przebieg jako dwufazowy, przy czym druga faza agregacji jest zależna od generacji tromboksanu (Ryc. 4).



Ryc. 3. Proponowany schemat przekazywania sygnałowego w płytce krwi pod wpływem działania adrenaliny

Fig. 3. Proposed scheme of signal transduction in the platelet in response to adrenaline

Receptory alfa-adrenergiczne obecne na powierzchni płytek krwi są to receptory sprzężone z białkami G (G protein-coupled receptors – GPCR). Przyłączenie liganda do tego receptora skutkuje zahamowaniem aktywności cykazy adenylanowej (AC), która produkuje cykliczny adenosynomonofosforan (cAMP) z adenosynotrifosforanu (ATP). Oprócz zahamowania AC, adrenalina uruchamia tzw. kaskadę kwasu arachidonowego, która skutkuje powstaniem tromboksanu A_2 – silnego aktywatora płytek krwi. Dochodzi również do wzrostu cytosolowego stężenia jonów wapnia. α_2 -adr – receptor α_2 -adrenergiczny, NHE – wymienniacz jonowy H^+/Na^+ , NCX – wymienniacz jonowy Na^+/Ca^{2+} , PLA_2 – fosfolipaza A_2 , AA – kwas arachidonowy, TxA_2 – tromboksan A_2 , TP – receptor tromboksanu, $PLC\beta$ – fosfolipaza $C\beta$, PIP_2 – dwufosforan fosfatydyloinozytolu, IP_3 – trofosforan inozytolu, DAG – diacyloglicerol, IP_3R – receptor, CIE – wymienniacz jonowy HCO_3^-/Cl^-



Ryc. 4. Porównanie przebiegu procesu agregacji płytek krwi mierzonej w PRP, wywołanej adrenaliną (2 fazy agregacji) oraz w hamowanej kwasem acetylosalicylowym (ASA, 1 faza agregacji). Wzrost transmisji światła przez próbkę koresponduje z postępowaniem agregacji
Fig. 4. Comparison of the process of PRP aggregation caused by adrenaline (two phases of aggregation) and inhibited by acetylsalicylic acid (one phase of aggregation).

Rola wymienniczy jonowych w szlaku sygnałowym adrenaliny

Wymieniacz (antyport) jonowy Na^+/H^+ (NHE), a w szczególności izoforma NHE1 wymiennicza, pełni istotną rolę w aktywacji płytek i właśnie z nim próbowano powiązać efekty wywoływane przez adrenalinę na płytce [32].

Samo działanie NHE polega na wprowadzaniu jonów Na^+ do wnętrza, zaś usuwaniu jonów H^+ na zewnątrz komórki. Konsekwencją aktywacji tego wymiennicza jest alkalizacja wnętrza płytki krwi. Ponadto, aktywacja NHE skutkuje przeladowaniem komórki jonami Na^+ , co z kolei prowadzi do aktywacji wymiennicza $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) w trybie inwersji. W podstawowym trybie pracy NCX usuwa z cytosolu 3 jony Ca^{2+} kosztem wprowadzenia 2 jonów Na^+ . Natomiast, jednym z warunków aktywacji płytek jest wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia, co jest zapewniane między innymi poprzez usuwanie zwiększonej ilości jonów Na^+ oraz napływ jonów Ca^{2+} do komórki w wyniku działania NCX w trybie inwersji [32]. Steen i wsp. wykazali, iż adrenalina może potencjalizować alkalizację cytoplazmy płytek krwi indukowaną trombiną poprzez aktywację NHE. Ponadto, według tej grupy badaczy sama adrenalina nie aktywuje wymiennicza Na^+/H^+ , co jest sprzeczne z wynikami otrzymanymi przez zespół Sweatt i wsp. [33, 34]. Co więcej, alkalizacja cytosolu płytki i podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapniowych wpływa stymulująco na aktywację innego enzymu ważnego w kontekście aktywacji płytek, fosfolipazy A_2 (PLA_2), która katalizuje uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych, który następnie wchodzi w szlak przemian skutkujący powstaniem tromboksanu A_2 – silnego, wtórnego aktywatora płytek [33, 35].

Warto również wspomnieć o tym, że w agregacji indukowanej adrenaliną istotną rolę odgrywają jony chlorkowe. W badaniach Spalding i wsp. adrenalina znacząco zwiększała wewnątrzpłytkowe stężenie jonów

chlorkowych, a substancje hamujące napływ jonów Cl^- do cytosolu, istotnie hamowały agregację płytek w odpowiedzi na adrenalinę [36].

Znaczenie tromboksanu A_2 w procesie aktywacji płytek krwi

Adrenalina uruchamia kaskadę kwasu arachidonowego, co sugeruje jeden z jej prawdopodobnych mechanizmów w procesie aktywacji płytek [37]. Utworzony w tym szlaku TxA_2 może dyfundować z wnętrza płytki, pobudzając pobliskie receptory tromboksanowe TP (receptory TP) w sposób autokryny oraz parakryny, zanim zostanie zhydrolizowany do nieczynnego TxB_2 . TxA_2 wzmacnia pierwotny bodziec aktywujący i pomaga w rekrutowaniu kolejnych płytek do miejsca uszkodzonego naczynia (będącego zarazem miejscem produkcji TxA_2). Krótki okres półtrwania tego związku (ok. 30 s) ogranicza rozprzestrzenianie się aktywacji płytek do pierwotnego obszaru uszkodzenia [15]. Receptory dla TxA_2 (TP) oddziałują z białkami G_q oraz G_{13} . Pobudzenie receptora TP prowadzi do aktywacji fosfolipazy C (*phospholipase C* – PLC) (izoformy β), co w efekcie prowadzi do uwalniania jonów wapnia z układu kanalików gęstych oraz aktywacji kinazy białkowej C (PKC). Ponadto, aktywowane zostają białka należące do rodziny Rho, prowadzące do remodelingu aktyny i zmiany kształtu płytki [19]. W efekcie obserwuje się silną aktywację płytki krwi, prowadzącą do sekrecji i agregacji.

Aktywność prokoagulacyjna

Dotychczasowe badania nad wpływem adrenaliny na odpowiedź płytek krwi koncentrowały się na procesie agregacji płytek, nie uwzględniały natomiast jej potencjalnego modulującego działania na aktywność prokoagulacyjną płytek krwi. Zjawisko to odnosi się do utraty asymetrii błony plazmatycznej silnie aktywowanych płytek, co skutkuje

pojawieniem się ujemnie naładowanego fosfolipidu – fosfatydyloseryny (PS) – w zewnętrznej monowarstwie błony plazmatycznej płytek. Fragmenty błony bogate w PS stanowią miejsca asocjacji kompleksów aktywnych osoczowych czynników krzepnięcia. Powstające kompleksy tenazy (złożone z aktywnych czynników VIII i IX) oraz protrombinazy (kompleks aktywnych czynników V i X) proteolitycznie aktywują – odpowiednio – czynniki X i II (protrombinę). Prowadzi to do powstania dużej ilości aktywnej trombiny – enzymu przekształcającego rozpuszczony w osoczu fibrynogen w nierozpuszczalną fibrynę, jednocześnie będącego jednym z najsilniejszych fizjologicznych aktywatorów płytek krwi [38]. Proces ten zachodzi nawet 300 tysięcy razy wydajniej na powierzchni błon bogatych w PS niż w fazie płynnej osocza [39]. Otrzymane przez mnie wyniki badań nad wpływem adrenaliny na aktywność prokoagulacyjną płytek krwi wskazują, iż są one niezbędne do oceny znaczenia tego hormonu jako agonisty płytkowego, zarówno *per se*, jak i w połączeniu z innymi aktywatorami płytek [badania własne, nieopublikowane].

Wpływ adrenaliny na hemostazę w warunkach przepływu

Niezbędny pozostaje także wpływ adrenaliny na adhezję płytek do powierzchni trombogennych i formowanie czopu płytkowego w warunkach reologicznych zbliżonych do tych, które występują *in vivo*, a także na inne etapy hemostazy – proces retrakcji skrzepu oraz fibrylizację. Niewiadomą jest także wpływ adrenaliny na architekturę skrzepów fibrynowo-płytkowych (*i.e.* ich gęstość i usieciowanie). Także wiele pytań odnośnie do wewnątrzkomórkowych procesów związanych z aktywacją płytki krwi ekspozowanej na adrenalinę wciąż pozostaje bez odpowiedzi.

Nowsze badania wskazują na zwiększenie statycznej adhezji płytek krwi ekspozowanych na adrenalinę do powierzchni pokrytych kolagenem. Warto podkreślić, że są to jedyne opublikowane dotychczas wyniki badań, w których zademonstrowano potencjalizację odpowiedzi płytek krwi przez niskie nanomolowe stężenia adrenaliny, a więc stężenia fizjologicznie bardzo prawdopodobne. Interesujące, że adrenalina wydaje się wykazywać różną potencję względem różnych subpopulacji płytek krwi. Płytki krwi zawieszane w osoczu, uzyskane poprzez wirowanie krwi pełnej przy przyspieszeniu $140 \times g$ były bardziej wrażliwe na działanie adrenaliny niż te uzyskane przy przyspieszeniu $220 \times g$ [14]. Sugeruje to, że reaktywność płytek względem adrenaliny jest pozytywnie skorelowana z ich wielkością. Istotne wydaje się również zbadanie wpływu adrenaliny na czynność płytek w warunkach reologicznych jak najlepiej odzwierciedlających fizjologiczne i patofizjologiczne warunki przepływu krwi. Otóż, adrenalina jest agonistą agregacji płytek indukowanej przepływem krwi (*shear-induced platelet aggregation* – SIPA) zależną od czynnika von Willebranda. Może to mieć znaczenie kliniczne, ponieważ okluzja wieńcowa jest często obecna w zwężonych naczyniach miażdżycowych pod wpływem stymulacji współczulnej związanej z wydzielaniem adrenaliny, a zatem w naczyniach, gdzie wartości szybkości ścinania (*shear rate*) są znacznie wyższe niż w warunkach normalnego (fizjologicznego) przepływu krwi [40]. Ocena działania adrenaliny na procesy hemostatyczne w warunkach przepływu krwi w modelu *in vitro* dostarczyłaby wiele informacji na temat jej działania w warunkach fizjologicznych.

Synergizmy

Mechanizm stanowiący podłoże dla potencjalizacji odpowiedzi płytek krwi wywołanych podprogowymi stężeniami innych agonistów przez adrenalinę nie jest jeszcze w pełni odkryty, uważa się jednak, że jest on związany z aktywacją fosfolipazy C. Warto jednak przyjrzeć się potencjalnej roli innego enzymu związanego z procesem aktywacji płytek – kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K). Wielu agonistów płytkowych aktywuje tę kinazę poprzez mechanizm niezależny od aktywacji PLC lub mobilizacji zmagazynowanych w płytkach jonów wapnia. Prace nad tym zagadnieniem ukazały powiązanie PI3K z procesem potencjalizacji odpowiedzi płytek przez adrenalinę. Zjawisko to demonstrowane jest poprzez silny synergistyczny efekt adrenaliny na aktywację PI3K indukowaną trombiną bądź SFRLN (peptyd aktywujący receptor trombinowy) [41]. W innych przeprowadzonych badaniach adrenalina (w stężeniach niezdolnych do zainicjowania agregacji) wzmacniała procesy napływu jonów wapnia do wnętrza płytki krwi ze środowiska zewnętrznego oraz mobilizacji wewnątrzkomórkowego rezerwuaru jonów wapnia indukowanych ADP. Wzrost stężenia jonów wapnia w cytosolu płytek, wywołany przez adrenalinę, prowadził do fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny oraz aktywacji PKC, co finalnie skutkowało nasiloną agregacją płytek krwi [41-43]. Nie tylko agregacja indukowana podprogowymi stężeniami ADP, ale także sekrecja dodatkowej puli ADP z ziarnistości gęstych płytek krwi (niezbędna do zajścia drugiej fazy agregacji) były zwiększone w obecności adrenaliny [44]. Kluczowy wydaje się fakt, że adrenalina (oprócz wymienionych mechanizmów) zwiększa także powinowactwo ADP do właściwych mu receptorów purynergicznych [45]. Stwierdzono także, że kombinacja adrenaliny i ADP powodowała zwiększenie liczby cząsteczek fibrynogenu w przeliczeniu na pojedynczą płytkę krwi niż miało to miejsce przy stymulacji samą adrenaliną bądź samym ADP [46].

Kliniczne zastosowanie adrenaliny w hematologii

Warte uwagi są kliniczne aspekty wykorzystania adrenaliny w celu leczenia bądź zapobiegania wystąpieniu stanu patologicznego u pacjentów. Adrenalina, która naturalnie wydzielana jest w organizmie w sytuacji zagrożenia czy stresu, mobilizuje go do reakcji poprzez: obkurczenie naczyń krwionośnych (dzięki czemu wzrasta ciśnienie tętnicze), zmniejszenie obrzęku tkanek i redukcję wydzielania substancji zapalnych z komórek tucznych. Te właściwości wykorzystywane są przy postępowaniu medycznym w sytuacji ratowania życia pacjenta, u którego wystąpił wstrząs anafilaktyczny [47].

Głównym motywem prób wdrażania adrenaliny w leczeniu hematologicznym jest tymczasowa poprawa reaktywności płytek krwi, mająca na celu zredukowanie ryzyka krwawień u pacjentów poddanych farmakoterapii przeciwpłytkowej.

Rutynowo stosowane są podśluzówkowe iniekcje adrenaliny w celu zapobiegania krwawieniom po zabiegu polipektomii. Wykazano, iż to postępowanie łączy w sobie zarówno bezpieczeństwo, jak i korzyści dla pacjentów wymagających takiej prewencji. W przypadkach, gdy polipy są większe niż 20 mm, stosuje się leczenie skojarzone, w którym leczenie iniekcją adrenaliny jest połączone z umieszczeniem

mechanicznych urządzeń hemostatycznych, co może być skuteczniejsze w ograniczeniu występowania krwawienia [48].

Singh i wsp. dowiedli, że adrenalina potencjalizuje agregację płytek krwi indukowaną ADP w próbkach krwi pacjentów leczonych tikagrelor. Blokowanie receptora P2Y₁₂ (np. przez tikagrelor) hamuje odpowiedź płytki wywołaną przez ADP. Adrenalina, wiążąc się w podanym przypadku do receptora α_2 -adrenergicznego, aktywuje szlaki sygnałowe zbliżone do tych pochodzących od receptora P2Y₁₂. Suplementacja ADP w kombinacji z adrenaliną do próbek krwi pochodzących od pacjentów włączonych w terapię tikagrelor wywoływała silniejszą agregację płytek niż przy podawaniu tych agonistów pojedynczo. Uwagę zwracają jednak wysokie, niefizjologiczne stężenia adrenaliny stosowane podczas przeprowadzanych eksperymentów *in vitro* (770 nmol/l), przy których osiągany był najlepszy efekt wzmacniającej odpowiedź płytek [49]. Autorzy wnioskują, iż infuzje adrenaliny mogą stać się nową metodą poprawy funkcji płytek krwi u pacjentów poddanych farmakoterapii przeciwplatekowej podczas krwawień bądź operacji. Rodzi to dodatkowe pytania dotyczące bezpieczeństwa proponowanej strategii, szczególnie pod kątem potencjalnych komplikacji hemodynamicznych. Dodatkowym czynnikiem, który musi zostać uwzględniony przy potencjalnym wykorzystaniu adrenaliny do zapobiegania krwawieniom w terapii tikagrelor, jest zróżnicowana reaktywność płytek krwi w odpowiedzi na ADP i adrenalinę, obserwowana w populacji zdrowych ochotników [26]. W dalszych badaniach, prowadzonych już na zdrowych ochotnikach, Singh i wsp. dowiedli, iż wlewy adrenaliny, w klinicznie istotnych dawkach, poprawiają reaktywność płytek krwi *in vivo*. Autorzy zaproponowali, że adrenalinę można potencjalnie wykorzystać do zapobiegania powikłaniom krwawienia okołoperacyjnego u pacjentów leczonych tikagrelor. Jednakże niezbędne wydaje się przeprowadzenie dodatkowych badań na pacjentach w celu dokładniejszego określenia klinicznej wartości tych obserwacji [50].

Podsumowanie i perspektywy

Płytki krwi odgrywają istotną rolę w patogenezie epizodów zatorowo-zakrzepowych poprzez formowanie zakrzepów płytkowych

oraz nasilanie powstawania fibryny. Wysoka śmiertelność, charakterystyczna dla chorób wiążących się z ryzykiem powikłań zatorowo-zakrzepowych, zwraca uwagę na płytki krwi jako główny cel interwencji terapeutycznych [24]. Wiele aspektów związanych z wpływem adrenaliny na proces aktywacji płytek krwi pozostaje nadal niewiadomymi. Uzyskanie kompletnego obrazu wpływu adrenaliny na hemostazę stanowi wielkie wyzwanie badawcze. Osiągnięcie tego ambitnego celu umożliwi opracowanie skuteczniejszych strategii prewencyjnych w celu zapobiegania występowaniu epizodów zakrzepowych w stanach podwyższonego stężenia adrenaliny we krwi. Ważnym aspektem obecnych i przyszłych badań jest zidentyfikowanie molekularnych i biochemicznych szlaków sygnałowych aktywowanych przez ten hormon. Niezwykła złożoność procesów hemostazy wymaga obrania odpowiedniego podejścia koncepcyjnego i metodologicznego podczas ich analizy oraz dołożenia jak największych starań do prowadzenia badań w warunkach najbardziej zbliżonych do tych panujących w organizmie człowieka (symulacja warunków *in vivo*).

Wkład autorów / Authors' contributions

A.G. napisała manuskrypt, przygotowała ryciny i przeprowadziła eksperyment przedstawiony na rycinie 4.

Konflikt interesu / Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

Finansowanie / Financial support

Publikacja finansowana z projektu statutowego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku: N/ST/MN/17/001/2201.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo

References

- [1] Italiano JE Jr., Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999;147:1299–1312.
- [2] Heemskerk JW, Mattheij NJ, Cossmans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013;13:2–16.
- [3] Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:37–47.
- [4] Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009;23:177–89.
- [5] Varon D, Shai E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J Thromb Haemost* 2015;15:540–6.
- [6] Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 2002; 30: 450–9.
- [7] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1622–30.
- [8] Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G.. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:112–16.
- [9] Hugel B, Socie G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999;93:3451–56.

- [10] Vidal C, Spaulding C, Picard F, et al. Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thromb Haemost* 2001;86:784–90.
- [11] Paudel KR, Panth N, Kim DW. Circulating endothelial microparticles: a key hallmark of atherosclerosis progression. *Scientifica (Cairo)* 2016;8514056.
- [12] Dziedzic M, Czukiewska E, Solski J. Catecholamines. The outline of biochemistry properties. *Farm Przegl Nauk* 2008;7-8:43–8.
- [13] Dimsdale JE, Moss J. Plasma catecholamines in stress and exercise. *JAMA* 1980;243:340–42.
- [14] Eriksson AC, Whiss PA. Nanomolar concentrations of adrenaline induce platelet adhesion in vitro. *Platelets* 2013;24:129–35.
- [15] Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol* 2012;210:59–85.
- [16] Born GVR, Smith JB. Uptake, metabolism and release of [3H]-adrenaline by human platelets. *Br J Pharmacol* 1970;39:765–78.
- [17] Smith SK, Limbird LE. Solubilization of human platelet alpha-adrenergic receptors: evidence that agonist occupancy of the receptor stabilizes receptor – effector interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4026–30.
- [18] Burkhardt J, Vaudel M, Gambaryan S, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* 2012;120:e73–e82.
- [19] Woulfe DS. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:2193–200.
- [20] Wetttschureck N, Moers A, Offermanns S. Mouse models to study G-protein-mediated signaling. *Pharmacol Ther* 2004;101:75–89.
- [21] Micieli G, Cavallini A. New therapeutic strategies with antiplatelet agents. *Neurol Sci* 2004;25:13–5.
- [22] Cameron HA, Ardlie NG. The facilitating effects of adrenaline on platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Med* 1982;9:117–28.
- [23] Steen VM, Holmsen H, Aarbakke G. The platelet stimulating effect of adrenaline through alpha 2-adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true stimulatory platelet agonist. Evidence that adrenaline per se does not induce human platelet activation in vitro. *Thromb Haemost* 1993;70:506–13.
- [24] Mati E, Piperea-Sianu A, Sarbu I, Croitoru A, Borisova S. In vitro research of the concentration dependence of effect of adrenaline on platelets aggregation. *Curr Health Sci J* 2017;43:41–46.
- [25] Lanza F, Beretz A, Stierle A, Hanau D, Kubina M, Cazenave JP. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol* 1988;255:1276–88.
- [26] Lindkvist M, Fernberg U, Ljungberg LU, et al. Individual variations in platelet reactivity towards ADP, epinephrine, collagen and nitric oxide, and the association to arterial function in young, healthy adults. *Thromb Res* 2019;174:5–12.
- [27] Rao AK, Willis J, Kowalska MA, Wachtfogel YT, Colman RW. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet alpha2-adrenergic receptor defect. *Blood* 1988;71:494–501.
- [28] Tamponi G, Pannocchia A, Arduino C, et al. Congenital deficiency of alpha-2-adrenoceptors on human platelets: description of two cases. *Thromb Haemost*, 1987;58:1012–6.
- [29] Zhang G, Xiang B, Ye S, et al. Distinct roles for Rap1b protein in platelet secretion and integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ outside-in signaling. *J Biol Chem* 2011;286:39466–77.
- [30] Sokolowska B. Repetytorium z fizjologii hemostazy. *Acta Haematol Pol* 2010;41:245–52.
- [31] Siess W, Weber PC, Lapetina EG. Activation of phospholipase C is dissociated from arachidonate metabolism during platelet shape change induced by thrombin or platelet-activating factor. Epinephrine does not induce phospholipase C activation or platelet shape change. *J Biol Chem* 1984;259:8286–92.
- [32] Chang HB, Gao X, Nepomuceno R, Hu S, Sun D. Na^+/H^+ exchanger in regulation of platelet activation and paradoxical effects of cariporide. *Exp Neurol* 2015;272:11–16.
- [33] Steen VM, Cook CA, Tysnes OB, Holmsen H. Potentiation by adrenaline of thrombin-induced elevation of pHi is not essential for synergistic activation of human platelets. *FEBS Lett* 1989;250:211–4.
- [34] Sweatt JD, Connolly TM, Cragoe EJ, Limbird LE. Evidence that Na^+/H^+ exchange regulates receptor-mediated phospholipase A2 activation in human platelets. *J Biol Chem*, 1986; 261: 8667–73.
- [35] Baron BM, Limbird LE. Human platelet phospholipase A2 activity is responsive in vitro to pH and Ca^{2+} variations which parallel those occurring after platelet activation in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1988;971:103–11.
- [36] Spalding A, Vaitkevicius H, Dill S, MacKenzie S, Schmaier A, Lockette W. Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation. *Hypertension* 1998;31:603–7.
- [37] Purchase M, Dusting GJ, Li DM, Read MA. Physiological concentrations of epinephrine potentiate thromboxane A2 release from platelets in the isolated rat heart. *Circ Res* 1986;58:172–6.
- [38] Lentz BR. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* 2003;42:423–38.
- [39] Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine factor V and factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979;254:10952–62.
- [40] Goto S, Ikeda Y, Murata M, et al. Epinephrine augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation. *Circulation* 1992;86:1859–63.
- [41] Selheim F, Frøyset AK, Stranda I, Vassbotn FS, Holmsen H. Adrenaline potentiates PI 3-kinase in platelets stimulated with thrombin and SFRLN: role of secreted ADP. *FEBS Lett* 2000;485:62–6.
- [42] Olbrich C, Aepfelbacher M, Siess W. Epinephrine potentiates calcium mobilization and activation of protein kinases in platelets stimulated by ADP through a mechanism unrelated to phospholipase C. *Cell Signal* 1989;1:483–92.
- [43] Powling MJ, Hardisty RM. Potentiation by adrenaline of Ca^{2+} influx and mobilization in stimulated human platelets: dissociation from thromboxane generation and aggregation. *Thromb Haemost* 1988;59:212–15.
- [44] Mills DCB, Roberts GCK. Effects of adrenaline on human blood platelets. *J Physiol* 1967;193:443–53.
- [45] Figures WR, Searce LM, Wachtfogel Y, Chen J, Colman RF, Colman RW. Platelet ADP receptor and alpha 2-adrenoceptor interaction. Evidence for an ADP requirement for epinephrine-induced platelet activation and an influence of epinephrine on ADP binding. *J Biol Chem* 1986;261:5981–6.

- [46] Plow EF, Marguerie GA. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by epinephrine and the combination of epinephrine and ADP. *J Biol Chem* 1980;255:10971–7.
- [47] Sicherer SH, Simons FER. Epinephrine for first-aid management of anaphylaxis. *Pediatrics* 2017;139 pii: e20164006.
- [48] Tullavardhana T, Akranurakkul P, Ungkitphaiboon W, Songtish D. Efficacy of submucosal epinephrine injection for the prevention of postpolypectomy bleeding: a meta-analysis of randomized controlled studies. *Ann Med Surg* 2017;19:65–73.
- [49] Singh S, Malm CJ, Ramstrom S, Hesse C, Jeppsson A. Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients. *Res Pract Thromb Haemost* 2018;2:718–25.
- [50] Singh S, Damén T, Nygren A, et al. Adrenaline improves platelet reactivity in ticagrelor-treated healthy volunteers. *Thromb Haemost* 2019;119:735–43.