

Akademia Medyczna w Gdańsku

Anna Michno

Wpływ cukrzycy na różne drogi metabolizmu reszty  
acetylowej i funkcję płytek krwi

Praca doktorska

Praca wykonana  
w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej  
Katedry Biochemii Klinicznej  
Akademii Medycznej w Gdańsku

Promotor:  
Prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz

Kierownik Zakładu i Katedry  
Prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz

Praca została wykonana w ramach grantu KBN 3 PO5B 082 23 oraz W-144

Gdańsk 2007

Część wyników dotycząca wpływu L-karnityny oraz inhibitorów liazy ATP-cytrynianowej na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych oraz wyników dotyczących wpływu cukrzycy na poziom ATP i ADP w krwinkach płytkowych została opublikowana w artykułach:

**Michno A**, Bielarczyk H, Pawełczyk T, Jankowska-Kulawy A, Klimaszewska J, Szutowicz A. Alterations of adenine nucleotide metabolism and function of blood platelets in patients with diabetes. *Diabetes*. 2007; 56: 462-467.

**Michno A**, Raszeja-Specht A, Jankowska-Kulawy A, Pawełczyk T, Szutowicz A. Effect of L-carnitine on acetyl-CoA content and activity of blood platelets in healthy and diabetic persons. *Clin Chem*. 2005; 51: 1673-1682.

**Michno A**, Skibowska A, Raszeja-Specht A, Ćwikowska J, Szutowicz A. The role of adenosine triphosphate citrate lyase in the metabolism of acetyl-coenzyme A and function of blood platelets in diabetes mellitus. *Metabolism*. 2004; 53: 66-72.

Składam serdeczne podziękowania  
Mojemu Promotorowi  
Panu Profesorowi Andrzejowi Szutowiczowi  
za motywację, wyrozumiałość  
oraz  
za nieocenioną pomoc merytoryczną  
i praktyczną przy wykonywaniu i redagowaniu  
niniejszej pracy

Serdecznie dziękuję:

Dr Marii Tomaszewicz  
Dr Hannie Bielarczyk  
Dr Annie Skibowskiej-Bielińskiej  
Dr Agnieszce Janowskiej-Kulawy  
Dr Annie Raszeji-Specht  
mgr Sylwii Gul-Hinc  
mgr Annie Ronowskiej  
dr Marzenie Grdeń

za wszelką pomoc w trakcie realizacji tej pracy i wspaniałą atmosferę

Dziękuję  
Dr Ewie Semetkowskiej-Jurkiewicz  
z Regionalnego Centrum Diabetologii AMG  
za informacje kliniczne

Dziękuję Zespołowi Flebotomistów ACK AMG

Dziękuję również Mojej Rodzinie  
oraz wszystkim sympatykom tej pracy  
i krwinek płytkowych za wsparcie  
w trakcie jej realizacji

## OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

AA	kwas arachidonowy
AGEs	produkty zaawansowanej nieenzymatycznej glikacji białek (ang. <u>A</u> dvanced <u>G</u> lycation <u>E</u> nd <u>P</u> roducts),
cAMP	cykliczny AMP
cGMP	cykliczny GMP
3-BrPG	3-bromopirogronian
DAG	diacyloglicerol
DNTB	kwask 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy
eNOS	endotelialna izoforma syazy tlenku azotu
G-6-P	glukoza-6-fosforan
G-6-PDH	dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa
Glut3	transporter glukozy typu 3
GP	glikoproteina
GPRP	tetrapeptyd-(H-Gly-Pro-Arg-Pro-NH <sub>2</sub> )
GSK3	kinaza syntazy glikogenu (ang. Glycogen Synthase Kinase-3)
(-)HC	(-)hydroksycytrynian
Hb	hemoglobina
HbA <sub>1c</sub>	hemoglobina glikowana
HDL	frakcja cholesterolu o wysokiej gęstości ( ang. <u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoproteins)
Ht	hematokryt
IP3	inozytolo(1,4,5)trifosforan
IRS	białko fosforylowane przez kinazę tyrozynową receptora insuliny (ang. <u>I</u> nsulin <u>R</u> eceptor <u>S</u> ubstrat)
LDL	frakcja cholesterolu o niskiej gęstości ( ang. <u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoproteins)
MDA	dialdehyd malonowy
MPV	średnia objętość krwinek płytkowych
NO	tlenek azotu
3-NPA	3-nitropropionian
PAF	czynnik aktywujący płytki krwi
PAR 1 i 4	receptory trombinowe aktywowane przez proteazy (ang. <u>P</u> rotease- <u>A</u> ctivated <u>R</u> eceptors)
PDH	dehydrogenaza pirogronianowa

PI-3K	kinaza-3 –fosfatydyloinozytolu
PIP <sub>3</sub>	trójfosfatydyloinozytol
PKB	kinaza białkowa B (ang. <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>B</u> )
PKC	kinaza białkowa C (ang. <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u> )
PLT	liczba krwinek płytkowych
RBC	liczba krwinek czerwonych
ROS	Reaktywne formy tlenu (ang. <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies)
SDH	dehydrogenaza bursztynianowa
SDS	siarczan dodecyłu sodowy
TBARS	związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym ( ang. <u>T</u> hiob <u>a</u> rbituric <u>A</u> cid <u>R</u> eactive <u>S</u> pecies)
TRAP-6	peptyd 6 aktywujący receptor dla trombiny
TXA <sub>2</sub>	tromboksan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	tromboksan B <sub>2</sub>
WBC	liczba krwinek białych

## SPIS TREŚCI

Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli.....	5
Wykaz rycin i tabel umieszczonych w tekście.....	12
1. STRESZCZENIE.....	16
2. WSTĘP.....	18
2.1. Naczyniowe patomechanizmy cukrzycy.....	18
2.2. Receptory i struktura krwinek płytkowych.....	20
2.3. Funkcja krwinek płytkowych: aktywacja, adhezja, agregacja.....	22
2.4. Nukleotydy w krwinkach płytkowych.....	25
2.5. Transport glukozy.....	27
2.6. Tlenek azotu.....	28
2.7. Metabolizm energetyczny krwinek płytkowych.....	29
2.8. Modyfikacja metabolizmu i funkcji płytek krwi.....	32
2.8.1. L-karnityna.....	32
2.8.2. Inhibitory przemian energetycznych a funkcja krwinek płytkowych.....	33
2.9. Płytki krwi a cukrzyca.....	34
3. CEL PRACY.....	39
4. MATERIAŁY I METODY.....	40
4.1. Grupy doświadczalne.....	40
4.2. Pobieranie krwi.....	40
4.3. Odczynniki i materiały zużywalne.....	41
4.3.1. Odczynniki.....	41
4.3.2. Materiały zużywalne.....	42
4.4. Ocena parametrów morfologicznych krwi.....	42
4.5. Ocena stanu glikemii. Pomiar glukozy, hemoglobiny glikowanej, fruktozaminy...42	
4.5.1. Pomiar glukozy.....	42
4.5.2. Pomiar fruktozaminy.....	42
4.5.3. Pomiar hemoglobiny glikowanej.....	42
4.6. Izolacja krwinek płytkowych.....	43
4.7. Agregacja krwinek płytkowych.....	43
4.8. Reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym.....	44
4.9. Białko całkowite.....	44
4.10. Immunodetekcja białka transportera glukozy Glut3.....	44

4.11. Oznaczanie aktywności enzymów krwinek płytkowych.....	46
4.11.1. Syntetaza kwasów tłuszczowych.....	46
4.11.2. Syntetaza cytrynianowa.....	46
4.11.3. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej.....	46
4.11.4. Kompleks dehydrogenazy $\alpha$ -ketogluutaranowej.....	47
4.11.5. Akonitaza.....	47
4.11.6. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa.....	48
4.11.7. Dehydrogenaza mleczanowa.....	48
4.11.8. Dehydrogenaza glutaminianowa.....	48
4.11.9. Dehydrogenaza bursztynianowa.....	48
4.11.10. Liaza ATP-cytrynianowa.....	49
4.12. Badanie parametrów metabolizmu krwinek płytkowych.....	49
4.12.1. Oznaczania całkowitego acetylo-CoA.....	49
4.12.2. Oznaczanie mitochondrialnego acetylo-CoA.....	51
4.12.3. Oznaczanie ATP i ADP.....	51
4.12.3.1. Oznaczanie ATP.....	51
4.12.3.2. Oznaczanie ADP.....	52
4.12.4. Oznaczanie poziomu glukozy-6-fosforanu.....	52
4.13. Metody statystyczne.....	52
5. WYNIKI.....	53
5.1. Charakterystyka grup doświadczalnych.....	53
5.1.1. Charakterystyka pacjentów.....	53
5.1.2. Wpływ cukrzycy na parametry stanu glikemii i gospodarkę lipidową.....	53
5.1.3. Parametry morfologiczne krwi.....	56
5.1.4. Parametry izolowanych krwinek płytkowych.....	57
5.1.5. Rozdział frakcji mitochondrialnej i cytosolowej krwinek płytkowych.....	58
5.2. Parametry metaboliczne krwinek płytkowych.....	58
5.2.1. Wpływ cukrzycy na zawartość i dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.....	58
5.2.2. Korelacja między stężeniem fruktozaminy w osoczu a zawartością acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.....	61
5.3. Aktywność enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.....	63
5.4. Zawartość glukozy-6-fosforanu w krwinkach płytkowych.....	64



5.5. Zawartość i uwalnianie ATP i ADP w krwinkach płytkowych.....	65
5.5.1. Korelacja między stężeniem fruktozaminy w osoczu i zawartością ATP w krwinkach płytkowych.....	68
5.6. Wpływ cukrzycy na funkcję krwinek płytkowych.....	70
5.6.1. Wpływ cukrzycy na agregację krwinek płytkowych.....	70
5.6.2. Wpływ cukrzycy na akumulację TBARS w krwinkach płytkowych.....	72
5.6.3. Korelacja między stężeniem fruktozaminy i funkcją krwinek płytkowych.....	74
5.6.4. Korelacja między poziomem acetylo-CoA w płytkach i funkcją krwinek płytkowych.....	74
5.6.5. Korelacje między zawartością ATP i ADP w płytkach krwi i funkcją krwinek płytkowych.....	75
5.7. Zawartość transportera Glut3 w krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą.....	77
5.8. Wpływ suraminy na zawartość ATP, ADP i funkcję krwinek płytkowych.....	79
5.9. Wpływ 3-bromopirogonianu (3-BrPG) na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych.....	82
5.9.1. Wpływ stężenia 3-BrPG na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	82
5.9.2. Wpływ stężenia 3-BrPG na poziom acetylo-CoA.....	84
5.9.3. Wpływ stężenia 3-BrPG na zawartość ATP w krwinkach płytkowych.....	84
5.9.4. Wpływ stężenia 3-BrPG na funkcję krwinek płytkowych.....	85
5.9.5. Wpływ 3-BrPG na wewnątrzpłytkową dystrybucję acetylo-CoA w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych.....	87
5.9.6. Wpływ 3-BrPG na zawartość ATP i ADP w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych.....	89
5.9.7. Wpływ 3-BrPG na funkcję aktywowanych i nieaktywowanych krwinek płytkowych.....	91
5.10. Wpływ 3-nitropropionianu (3-NPA) na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych.....	92
5.10.1. Wpływ stężenia 3-NPA na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	92
5.10.2. Wpływ 3-NPA na poziom acetyloCoA w krwinkach płytkowych.....	94
5.10.3. Wpływ stężenia 3-NPA na zawartość ATP i ADP w krwinkach płytkowych....	94

5.10.4. Wpływ 3-NPA na funkcję krwinek płytkowych.....	96
5.11. Wpływ L-karnityny na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych.....	97
5.11.1. Wpływ stężenia L-karnityny na poziom acetylo-CoA w krwinkach płytkowych .....	97
5.11.2. Wpływ L-karnityny na wewnątrzkomórkową dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.....	98
5.11.3. Wpływ L-karnityny na zawartość ATP i ADP w krwinkach płytkowych.....	99
5.11.4. Wpływ L-karnityny na funkcję krwinek płytkowych.....	100
5.11.5. Wpływ L-karnityny na inhibicyjny wpływ 3-BrPG na parametry metaboliczne i funkcję krwinek płytkowych.....	102
5.12. Wpływ SB-204990 i (-)Hydroksycytrynianu ((-)HC) na metabolizm i funkcję krwinek płytkowych.....	104
5.12.1. Wpływ SB-204990 i (-)HC na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	104
5.12.2. Wpływ SB-204990 i (-)HC na aktywność krwinek płytkowych.....	105
6. DYSKUSJA.....	107
6.1. Charakterystyka grup doświadczalnych.....	107
6.1.1. Weryfikacja metody izolacji płytek krwi i mitochondriów płytkowych.....	110
6.2. Wpływ cukrzycy na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA krwinek płytkowych.....	111
6.3. Wpływ cukrzycy na poziom i dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.....	113
6.4. Wpływ cukrzycy na zawartość i uwalnianie ATP i ADP w krwinkach płytkowych.....	114
6.5. Wpływ cukrzycy na funkcję krwinek płytkowych.....	117
6.5.1. Wpływ cukrzycy na agregację krwinek płytkowych.....	117
6.5.2. Wpływ cukrzycy na akumulację TBARS.....	118
6.6. Wpływ cukrzycy na poziom transportera glukozy Glut3 krwinek płytkowych.....	120
6.7. Wpływ L-karnityny na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych.....	121
6.8. Wpływ inhibitorów przemian energetycznych na funkcję krwinek płytkowych...	124
6.8.1. Wpływ 3-bromopirogronianu na przemiany energetyczne i funkcję	

krwinek płytkowych.....	124
6.9. Wpływ 3-nitropropionianu na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych.....	127
6.10. Wpływ inhibitorów liazy ATP-cytrynianowej na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych.....	127
7. WNIOSKI.....	130
8. PIŚMIENNICTWO.....	132

## WYKAZ RYCIN I TABEL UMIESZCZONYCH W TEKŚCIE

Ryciny:	str.
1. Drogi metabolizmu glukozy i acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.....	30
2. Dystrybucja wartości Hb <sub>a1c</sub> we krwi i fruktozaminy w osoczu w badanych grupach.....	55
3. Dystrybucja zawartości całkowitego acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	61
4. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu a zawartością acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	62
5. Zawartość i uwalnianie ATP z krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą....	65
6. Zawartość i uwalnianie ADP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	66
7. Dystrybucja zawartości ATP i ADP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę.....	67
8. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu a zawartością ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.....	69
9. Dystrybucja wyników badań agregacji spontanicznej i po aktywacji trombiną w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą.....	71
10. Dystrybucja wyników badań akumulacji TBARS w warunkach spoczynkowych i po aktywacji trombiną w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą.....	73
11. Zawartość transportera Glut3 w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą. Zawartość $\beta$ -aktyny w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	78
12. Względny poziom transportera Glut3 w stosunku do poziomu $\beta$ -aktyny w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	78
13. Zależny od stężenia wpływ suraminy na zawartość ATP, ADP oraz agregację i akumulację TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	79
14. Wykres zależności aktywności dehydrogenazy pirogronianowej w homogenatach krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą od stężenia 3-bromopirogronianu. Wykresy Dixona inhibicji enzymu przez niskie i wysokie stężenia inhibitora .....	83
15. Wpływ wzrastających stężeń 3-bromopirogronianu na zawartość acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	84

16. Wpływ wzrastających stężeń 3-BrPG na zawartość ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	85
17. Wpływ wzrastających stężeń 3-BrPG na akumulację TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	86
18. Wpływ wzrastających stężeń 3-BrPG na agregację nieaktywowanych krwinek płytkowych.....	86
19. Wpływ 3-BrPG na zawartość i wydzielanie ATP w nieaktywowanych i aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą...	89
20. Wpływ 3-BrPG na zawartość i uwalnianie ADP w nieaktywowanych i aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych.....	90
21. Wpływ 3-BrPG na spoczynkową i indukowaną trombiną agregację krwinek płytkowych.....	91
22. Wpływ 3-BrPG na akumulację TBARS w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	92
23. Wpływ wzrastających stężeń 3-NPA na aktywność SDH w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą. Wykres Dixona inhibicji tego enzymu.....	93
24. Wpływ wzrastających stężeń 3-NPA na poziom acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	94
25. Wpływ wzrastających stężeń 3-NPA na poziom ATP i ADP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	95
26. Wpływ 10mM 3-NPA na spoczynkową i indukowaną trombiną agregację krwinek płytkowych.....	96
27. Wpływ 10mM 3-NPA na spoczynkową i indukowaną trombiną akumulację TBARS w krwinkach płytkowych.....	97
28. Zależny od stężenia wpływ L-karnityny na poziom acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	98
29. Wpływ L-karnityny na wewnątrzpłytkową dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	99
30. Wpływ 2.5mM L-karnityny na agregację spontaniczną i aktywowaną trombiną krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	101
31. Wpływ 2.5mM L-karnityny na akumulację TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	102
32. Wpływ SB 204990 i (-)HC na agregację spontaniczną i aktywowaną trombiną w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	106

Tabele:

1.	Dane demograficzne i parametry laboratoryjne gospodarki węglowodanowej i lipidowej osób zdrowych i chorych na cukrzycę.....	54
2.	Parametry morfologiczne krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na cukrzycę.....	56
3.	Parametry preparatu krwinek płytkowych otrzymanego metodą wirowań różnicowych.....	57
4.	Frakcjonowanie krwinek płytkowych digitoniną.....	58
5.	Zawartość i dystrybucja acetylo-CoA w nieaktywowanych i aktywowanych krwinkach płytkowych.....	59
6.	Aktywność enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	63
7.	Zawartość glukozy-6-fosforanu w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	64
8.	Agregacja krwinek płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę.....	70
9.	Akumulacja TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę.....	72
10.	Korelacja między stężeniem fruktozaminy i funkcją krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	74
11.	Korelacja między poziomem acetylo-CoA a agregacją i akumulacją TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	75
12.	Korelacja pomiędzy zawartością ATP i ADP a funkcją krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	76
13.	Korelacja pomiędzy ilością uwolnionego ATP i ADP a funkcją krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	77
14.	Wpływ 3-BrPG na wewnątrzkomórkową dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	88
15.	Wpływ L-karnityny na zawartość ATP i ADP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.....	100
16.	Wpływ L-karnityny i 3-BrPG na parametry metaboliczne i funkcję krwinek płytkowych.....	103
17.	Wpływ SB-204990 i (-)HC na aktywność lizy ATP-cytrynianowej w krwinkach płytkowych u osób zdrowych i z cukrzycą.....	104

18.	Wpływ SB i (-)HC na akumulację TBARS w nieaktywowanych i aktywowanych krwinkach płytkowych.....	105
-----	---	-----

## 1. STRESZCZENIE

W przedstawionej pracy weryfikowano hipotezę, że w cukrzycy przewlekła hiperglikemia poprzez zmiany metabolizmu acetylo-CoA może powodować nadmierną aktywność płytek krwi.

Badania przeprowadzone na pacjentach z cukrzycą typu 1 i 2 oraz ludziach zdrowych wykazały, że:

1. Stężenia fruktozaminy w osoczu i HbA<sub>1c</sub> we krwi u osób z cukrzycą było o ponad 50 % wyższe niż u osób zdrowych. Nie było różnic między pacjentami z cukrzycą typu 1 i 2.
2. Cukrzyca powodowała wzrost aktywności dehydrogenazy pirogronianowej,  $\alpha$ -ketoglutaranowej i glukozy-6-fosforanowej, akonitazy, liazy ATP-cytrynianowej i syntetazy kwasów tłuszczowych odpowiednio o 66, 33, 17, 37, 51 i 61%. Nie miała natomiast wpływu na aktywność syntazy cytrynianowej i dehydrogenazy bursztynianowej.
3. Zarówno w cukrzycy typu 1, jak i 2 obserwowano podobny wzrost poziomu acetylo-CoA, ATP/ADP, jak i agregacji i akumulacji TBARS odpowiednio o około 60, 75/60, 50 i 40% w stosunku do płytek krwi osób zdrowych.
4. Poziom mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 był o ponad 50% wyższy niż w płytkach osób zdrowych.
5. Korelacja między stężeniem fruktozaminy, a poziomem acetylo-CoA i ATP w płytkach pacjentów z cukrzycą była wyższa (odpowiednio  $r=0.52$ ,  $p<0.002$ ;  $r=0.69$ ,  $p<0.0001$ ) niż osób zdrowych (odpowiednio  $r=0.38$ ,  $p<0.04$ ;  $r=0.55$ ,  $p<0.008$ ).
6. Znamienność korelacji między poziomem acetylo-CoA, a agregacją i akumulacją TBARS w płytkach pacjentów z cukrzycą była wyższa (odpowiednio  $r=0.52$ ,  $p<0.005$  i  $r=0.68$ ,  $p<0.0001$ ) niż u osób zdrowych (odpowiednio  $r=0.11$ ,  $p<0.7$  i  $r=0.53$ ,  $p<0.005$ ).
7. W warunkach spoczynkowych suramina (antagonista receptorów purynergicznym) nie wpływała na zawartość ATP/ADP i funkcję płytek krwi obu grup. Natomiast w aktywowanych trombiną płytkach krwi osób z cukrzycą, suramina powodowała 2-3-krotnie większy spadek agregacji i akumulacji TBARS oraz 2-krotnie większy wzrost, obniżonej trombiną, zawartości ATP/ADP, niż w płytkach krwi osób zdrowych.



8. W płytkach osób z cukrzycą 3-bromopirogronian (inhibitor dehydrogenazy pirogronianowej) powodował około dwukrotnie większy spadek poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA, ATP, agregacji i akumulacji TBARS niż u osób zdrowych.

9. 3-nitropropionian (inhibitor dehydrogenazy bursztynianowej) nieznacznie zwiększał poziom całkowitego acetylo-CoA i nie zmieniał wielkości puli nukleotydów adenylowych w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą.

10. Inhibitory liazy ATP-cytrynianowej (SB-204990 i (-)HC) nie hamowały agregacji i akumulacji TBARS w płytkach nieaktywowanych. Natomiast po aktywacji trombiną powodowały większy spadek agregacji i akumulacji TBARS w płytkach pacjentów z cukrzycą niż w płytkach osób zdrowych.

11. L-karnityna zwiększała poziom mitochondrialnego (27%) i cytoplazmatycznego (97%) acetylo-CoA oraz agregację (95%) i akumulację TBARS (133%) w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą. Natomiast w krwinkach płytkowych osób zdrowych L-karnityna nie zmieniała poziomu acetylo-CoA, a jej wpływ na ich funkcję był o 50% mniejszy niż u pacjentów z cukrzycą. L-karnityna nie miała również wpływu na poziom ATP/ADP, ani nie odwracała inhibicyjnego wpływu 3-bromopirogronianu na parametry metaboliczne i funkcję krwinek płytkowych obu grup.

Dane te wskazują, że przewlekła hiperglikemia powoduje u osób z cukrzycą adaptacyjne zmiany w metabolizmie glukozy prowadzące do wzrostu poziomu mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA oraz zawartości ATP/ADP w płytkach krwi. Zmiany te mogły zwiększać reaktywność płytek krwi w przebiegu tej choroby. Istotną rolę w mechanizmie tych zmian może odgrywać wzrost transportu acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy poprzez drogi acetylo-transferazy karnitynowej i liazy ATP-cytrynianowej. Z kolei, wzrost poziomu acetylo-CoA w mitochondriach powodował zwiększenie puli nukleotydów adenylowych ATP/ADP, które byłyby odpowiedzialne za zwiększoną reaktywność płytek krwi osób z cukrzycą, w wyniku nadmiernej aktywacji receptorów purynergiczych po stymulacji trombiną.

## 2. WSTĘP

Cukrzyca występuje w przebiegu chorób, w których dochodzi do przewlekłego upośledzenia metabolizmu glukozy w komórkach, wynikającego z niedoboru insuliny lub zmniejszenia reakcji komórek na ten hormon. Według raportu WHO liczba pacjentów chorujących na cukrzycę na świecie w 2006 roku wynosiła 171 mln. Ocenia się, że w krajach Unii Europejskiej żyje obecnie około 25 milionów, a w Polsce 2 mln ludzi z rozpoznaną cukrzycą. Osoby te są zagrożone wystąpieniem poważnych powikłań, które są następstwem uszkodzenia lub nawet całkowitej niewydolności narządów, takich jak nerki, układ sercowo-naczyniowy, ośrodkowy układ nerwowy i narząd wzroku. Cukrzyca jest jednym z ważniejszych czynników ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego, np. zawału serca, udaru mózgu i chorób naczyń obwodowych. Z wymienionych powodów nieleczona lub źle prowadzona cukrzyca stanowi poważne zagrożenie dla życia, a także niekorzystnie wpływa na jego jakość i jest przyczyną inwalidztwa ludzi w każdym przedziale wiekowym (Noordzij i wsp. 2007).

### 2.1. Naczyniowe patomechanizmy cukrzycy

Przewlekła hiperglikemia w przebiegu cukrzycy uważana jest za podstawowy czynnik prowadzący do rozwoju powikłań naczyniowych w postaci mikro i makroangiopatii. Istotnym elementem tych patologii jest zgrubienie błony podstawnej naczyń krwionośnych i zmniejszenie ich elastyczności. Mikroangiopatię powodują zaburzenia metaboliczne komórek śródbłonka i podścieliska naczyń włosowatych, które poprzez nadmierną syntezę cytokin i czynników wzrostu przy istniejącej hiperglikemii prowadzą do odkładania się produktów zaawansowanej nieenzymatycznej glikacji białek (ang. Advanced Glycation End Products, AGEs), przerostu ścian naczyń oraz powstawania mikrozakrzepów. W patomechanizmie powyższych zmian, poza uszkodzeniem śródbłonka naczyniowego uczestniczą również zaburzenia funkcji i struktury osoczowych czynników krzepnięcia i fibrylizacji oraz modyfikacje struktury i funkcji krwinek płytkowych, monocytów i komórek plazmatycznych. Klinicznymi objawami mikroangiopatii są nefropatia, retinopatia i neuropatia cukrzycowe.

Mianem makroangiopatii określa się zmiany miażdżycowe w dużych i średnich naczyniach krwionośnych i związane z tym objawy kliniczne. Zmiany miażdżycowe dotyczą najczęściej dużych tętnic, tętniczek nerkowych i tętnic kończyn dolnych oraz

naczyń mózgowych i wieńcowych. Opisane zmiany naczyniowe w cukrzycy prowadzą do obniżenia jakości życia pacjentów i ich zwiększonej śmiertelności w porównaniu do populacji ludzi zdrowych (Calles-Escandon i wsp. 1999, Pyorala i wsp. 1999, Raman i wsp. 2006).

Utrzymująca się hiperglikemia niezależnie od typu cukrzycy prowadzi do przewlekłych zmian adaptacyjnych w metabolizmie oraz strukturze komórek różnych narządów. Zwiększony napływ glukozy do wnętrza komórek aktywuje jej przemianę do sorbitolu. Powoduje to zużycie NADPH, kofaktora niezbędnego do redukcji glutationu i zmniejszenie odporności komórek na działanie stresu oksydacyjnego (Kain i wsp. 2002). Dodatkowo, glukoza może być metabolizowana do N-acetylo-glukozaminy, czynnika zwiększającego ekspresję genów i syntezę czynnika transformacji wzrostu beta1 oraz aktywatora inhibitora plazminogenu-1 (Calles-Escandon i wsp. 1998). Również hiperglikemia *per se* działa toksycznie na śródbłonek naczyniowy oraz zwiększa stres oksydacyjny poprzez aktywację syntezy wolnych rodników tlenowych, głównie anionu ponadtlenkowego.

Aktywacja glikolitycznej przemiany glukozy w komórkach insulino-niezależnych prowadzi do akumulacji mleczanu i pirogronianu, a w konsekwencji do aktywacji dekarboksylacji oksydacyjnej pirogronianu oraz zwiększenia produkcji reaktywnych form tlenu w łańcuchu oddechowym (ang. Reactive Oxygen Species, ROS) (Brownlee, 2005). Nadmiar wolnych rodników prowadzi do zmian w ekspresji szeregu genów i modyfikuje wiele szlaków sygnalizacyjnych w komórce. Dla przykładu, aktywacja czynnika transkrypcyjnego kappa-B powoduje wzrost syntezy cytokin prozapalnych w monocytach osób z cukrzycą (Kreisberg, 1998). W warunkach hiperglikemii obserwowano zmniejszenie syntezy tlenku azotu (NO) spowodowane zmniejszeniem ekspresji mRNA i poziomu białka endotelialnej syntazy tlenku azotu (eNOS) (Srinivasan i wsp. 2004). Inne badania wykazały zwiększenie poziomu białka eNOS w stanach hiperglikemii, co może być tłumaczone zwiększoną inaktywacją tlenku azotu przez aniony ponadtlenkowe (Cosentino i wsp. 1997). Zmniejszona dostępność NO może być przyczyną zwiększonej adhezji krwinek płytkowych i uwalniania z nich różnych czynników wzrostu powodujących przerost ścian naczyń krwionośnych i upośledzenie zdolności naczyń do rozkurczu (Cohen, 1993, Klein i wsp. 1995). Zwiększa się również podatność frakcji cholesterolu o niskiej gęstości (LDL, ang. Low Density Lipoproteins) na glikację i utlenianie (Klein i wsp. 1995, Knott i wsp. 2003, Ravandi i wsp. 2000). Zmodyfikowane cząstki LDL mają silne właściwości

promiażdżycowe. Zwiększona synteza AGEs może być przyczyną zmian ekspresji genów cząstek adhezyjnych (Shinohara i wsp. 1998), uszkodzenia endotelium naczyń krwionośnych i zmian w przekaźnictwie sygnałów z receptorów powierzchniowych do wnętrza komórek (Brownlee, 2001).

Laboratoryjnymi markerami tych procesów są: zwiększona glikacja hemoglobiny (HbA<sub>1c</sub>) i albuminy (fruktozaminy), które służą do retrospektywnej oceny średniego poziomu glikemii u pacjentów z cukrzycą (Writing Team for the Diabetes Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group 2003, Manley, 2003, Winocour i wsp. 1988).

Inną zmianą wywołaną przez hiperglikemię jest nadmierna aktywacja kinazy białkowej C (PKC) prowadząca do fosforylacji i inhibicji eNOS i zwiększenia wydzielania endoteliny-1 ze śródbłonna naczyń krwionośnych. Dodatkowo nadmierna aktywacja PKC redukuje poziom białka receptora insuliny fosforylowanego przez kinazę tyrozynową (ang. Insulin Receptor Substrate 1, IRS-1) i zmniejsza wiązanie insuliny do IRS-1, co powoduje zahamowanie sygnału insulinowego, zmniejszenie fosforylacji PKB i jej substratów: białka p70 (p70) i kinazy syntazy glikogenu (ang. Glycogen Synthase Kinase-3, GSK3). Zwiększa to oporność mięśni gładkich naczyń krwionośnych na insulinę (Motley i wsp. 2001). Zaobserwowano również wzrost liczby agregatów płytkowo-monocytnych u pacjentów z cukrzycą typu 2, który korelowałby z zawartością HbA<sub>1c</sub> we krwi (Shoji i wsp. 2005).

## 2.2. Receptory i struktura krwinek płytkowych

Krwinki płytkowe pełnią istotną funkcję w procesie hemostazy. Są strukturami komórkowymi pozbawionymi jądra komórkowego, zawierającymi wysoce wyspecjalizowany cytoszkielet, unikalne receptory i ziarnistości wydzielnicze. Istnieją dwie hipotezy, które mogą wyjaśniać proces powstawania krwinek płytkowych z megakariocytów. Według pierwszej, krwinki płytkowe powstają w procesie prostej fragmentacji cytoplazmy megakariocytów (Kosaki, 2005). Z drugiej strony istnieją przesłanki, że krwinki płytkowe są tworzone *de novo* poprzez system mikrotubul, z proplatek powstających z wypustek cytoplazmy megakariocytów, do których transportowane są organelle wewnątrzkomórkowe po ich syntezie w peroksysomach megariocytów (Patel i wsp. 2005, Hartwig i wsp. 2006). Tworzenie płytek rozpoczynałoby się w momencie przesunięcia mikrotubuli do kory megakariocytów co umożliwiałoby proces wydłużania proplatek i oddzielania się od nich dojrzałych

krwinek płytkowych (Tablin i wsp. 1990). Proces ten modyfikowany jest przez hiperglikemię, która zwiększa płatowość megakariocytów u pacjentów z cukrzycą, powikłaną miażdżycą naczyń wieńcowych (Brown i wsp. 1997).

W stanie spoczynku krwinki płytkowe mają kształt dyskooidalny o średnicy 2-4  $\mu\text{m}$ , grubości 0.5-2  $\mu\text{m}$  i objętości 5-10  $\mu\text{m}^3$  (Mathur i Martin, 2002). Warstwa zewnętrzna błony komórkowej zawiera kanały należące do układu kontaktu struktur wewnętrznych z powierzchnią płytek (White, 2002). Na jej powierzchni znajdują się liczne glikoproteiny powierzchniowe (Weiss i wsp. 1995), będące receptorami niezbędnymi do aktywacji, procesu adhezji i agregacji krwinek płytkowych przez różnych agonistów (Clemeston, 1995). Jednym z kluczowych receptorów krwinek płytkowych jest integryna  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (glikoproteina IIb-IIIa), dla której podstawowym ligandem aktywującym jest fibrynogen. Może ona również wiązać witronektynę i czynnik von Willebranda. Inny kompleks glikoproteinowy, GPIb-IX-V jest ważnym receptorem umożliwiającym adhezję krwinek płytkowych do śródbłonka naczyń krwionośnych w obecności dużych sił ścinających, w małych naczyniach krwionośnych (ang. high shear stress). Z kolei glikoproteina IIb-IIIa spełnia tę funkcję przy małej sile ścinania (low shear stress).

Na powierzchni błony plazmatycznej płytek znajdują się również zaadsorbowane białka osoczowe, wśród których stwierdzono obecność immunoglobulin: IgG i IgM, plazminogenu oraz osoczowych czynników krzepnięcia (White, 2002). Błona komórkowa płytek dostarcza również lipidów będących aktywatorami krzepnięcia osoczowego (White, 2002). Zawiera ona także receptory powierzchniowe pełniące istotną rolę w aktywacji i agregacji płytek w miejscu uszkodzenia śródbłonka naczyń krwionośnych. Do ważnych receptorów tego typu należą: glikoproteina VI (GPVI) aktywowana przez kolagen, receptory dla trombiny aktywowane przez proteazy (ang. Protease-Activated Receptor 1 i 2-PAR1 i PAR4), (Gibbins i wsp. 1997, Kahn, 1998, Sambrano i wsp. 2001), receptor dla fibrynogenu - integryna  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (glikoproteina IIb-IIIa), (Bennett i wsp. 2001), receptory purynowe P2X wrażliwe na ATP oraz P2Y<sub>1</sub> i P2Y<sub>12</sub> aktywowane przez ADP (Ralevic i wsp. 1998). Ostatnio wykazano istnienie synergistycznego oddziaływania między receptorem PAR4 i receptorem P2Y<sub>12</sub>, w aktywacji agregacji płytek krwi (Holinstat i wsp. 2006). Krwinki płytkowe posiadają również receptory insulinowe (IRS-1 i IRS-2) o aktywności kinazy tyrozynowej, która autofosforyluje receptory insulinowe, następnie aktywując kinazę-3

fosfatydyloinozytolu (PI-3K) (Saltiel i wsp. 2001). Insulina hamuje funkcję płytek i mobilizację jonów wapniowych indukując fosforylację białek  $G_{i\alpha}$ , co prowadzi do ich inaktywacji i zabezpiecza płytki przed obniżeniem zawartości wewnątrzkomórkowego cAMP (Ferreira i wsp. 2004).

Na powierzchni krwinek płytkowych zidentyfikowano również szereg innych receptorów, które nie biorą bezpośrednio udziału w procesie hemostazy, ale mogą modyfikować kaskady sygnalizacyjne, a przez to funkcję płytek krwi. Do tej grupy można zaliczyć: receptory adrenergiczne- $\alpha_{2A}$ , receptory dla dopaminy (D2R, D3R i D5R) i wiele innych (Bugert i wsp. 2006, Garcia-Sevilla i wsp. 1990, Gurguis i wsp. 1999).

Ponadto, na powierzchni krwinek płytkowych są zlokalizowane transportery Glut dla glukozy, głównie podtyp Glut3 oraz minimalna ilość podtypu 1 (Heijnen i wsp. 1997, Ferreira i wsp. 2005). Krwinki płytkowe posiadają ziarnistości lizosomalne, zawierające kwaśne hydrolazy, odpowiedzialne za ich niszczenie w czasie krzepnięcia oraz ziarnistości magazynowe, zawierające substancje uwalniane podczas ich aktywacji. W ziarnistościach gęstych stwierdzono wysokie stężenia ATP, ADP, serotoniny i pirofosforanów. Ziarnistości alfa zawierają między innymi: fibrynogen osoczowy, megakariocytarny czynnik von Willebranda, tromboglobulinę, czynnik V, VIII, antyplazminę oraz czynniki stymulujące wzrost i przepuszczalność naczyń oraz chemotaksję. Krwinki płytkowe posiadają również peroksysomy, zawierające katalazę, która zabezpiecza je przed nadtlenkiem wodoru powstającym w reakcjach utleniania amin biogennych i hipoksantyny, katalizowanych odpowiednio przez monoaminooksydazę i oksydazę ksantynową. Wykazano również, że egzogenna katalaza hamowała produkcję tromboksanu  $A_2$  i  $IP_3$  i zmniejszała agregację płytek krwi (Pignatelli i wsp. 1998).

W krwinkach płytkowych znajdują się również kanaliki należące do układu kontaktu wnętrza krwinek z powierzchnią, odgrywające rolę w transporcie i magazynowaniu substancji z osocza oraz w uwalnianiu zawartości ziarnistości magazynowych w trakcie ich aktywacji. Retikulum endoplazmatyczne stanowi magazyn dla jonów wapnia, które również biorą udział w procesach kurczliwości i aktywacji krwinek płytkowych. Są tu również zlokalizowane enzymy niezbędne do syntezy prostaglandyn (White, 2002).

### 2.3. Funkcja krwinek płytkowych: aktywacja, adhezja, agregacja

Czas przeżycia krwinek płytkowych w krwioobiegu wynosi około 10 dni, chyba że

zostaną zużyte w procesach krzepnięcia krwi. Krwinki płytkowe pełnią kluczową rolę w procesie hemostazy poprzez udział w uszczelnianiu uszkodzonych naczyń krwionośnych (Ashby i wsp. 1990). Jest to możliwe dzięki zdolności płytek do zmiany kształtu, adhezji do powierzchni podśródbłonkowej naczyń krwionośnych, agregacji i wytwarzania skrzepu z udziałem osoczowych czynników krzepnięcia. Aktywacja, a w konsekwencji agregacja krwinek płytkowych są procesami indukowanymi przez różne zewnętrzne- i wewnętrzne płytkowe aktywatory. Aktywatory zewnętrzne powstają w warstwie podśródbłonkowej uszkodzonych naczyń krwionośnych. Należą do nich, między innymi: kolagen, trombina i epinefryna. Natomiast aktywatory endogenne są wydzielane przez płytki z ziarnistości magazynowych i retikulum endoplazmatycznego w trakcie ich aktywacji. Należą do nich między innymi: ADP, tromboksan  $A_2$ , serotonina, czynnik von Willebrandta czy też tromboglobulina (Ashby i wsp. 1990). Aktywatory krwinek płytkowych przez odpowiednie receptory błonowe aktywujące sygnałowe białka G i kinazy tyrozynowe indukują kaskady sygnalizacyjne i odpowiadają za zmianę ich kształtu, adhezję, sekrecję i agregację.

W wewnątrzkomórkowej aktywacji płytek krwi ważną rolę odgrywają: szlak fosfoinozytolowy i kaskada kwasu arachidonowego. W wyniku pobudzenia receptorów PAR1 i PAR4 związanych z białkami  $G_q$  dochodzi do aktywacji fosfolipazy C i szlaku fosfoinozytolowego. W konsekwencji powstają wtórne przekaźniki informacji diacyloglicerol (DAG) i trifosforan inozytolu (IP3), które pełnią istotną funkcję w dalszej aktywacji płytek. IP3 mobilizuje jony  $Ca^{2+}$  z retikulum endoplazmatycznego, co powoduje aktywację fosfolipazy  $A_2$ . Uwalniany przez nią kwas arachidonowy jest metabolizowany do tromboksanu  $A_2$  przez cyklooksigenazę. DAG aktywuje kinazę białkową C, co prowadzi do fosforylacji takich białek jak: integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb-IIIa; CD41b/CD61), receptor dla fibrynogenu i uwalniania zawartości ziarnistości płytkowych do przestrzeni pozakomórkowej. W trakcie aktywacji krwinek płytkowych następuje eksternalizacja glikoprotein powierzchniowych (GP) o właściwościach integryn i nie-integryn, które stają się receptorami agonistów krwinek płytkowych i białek adhezyjnych powodujących ich agregację (Asby i wsp. 1990). Integryna  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa-IIa; CD49b/CD29) aktywuje proces adhezji krwinek płytkowych do kolagenu zarówno w warunkach spoczynkowych jak i po aktywacji przez siły ścinające podczas przepływu krwinek płytkowych przez naczynia włosowate (shear stress) (Saelman i wsp. 1994). Z kolei integryna- $\alpha_{IIb}\beta_3$ , która w warunkach spoczynkowych znajduje się w ziarnistościach alfa, po aktywacji płytek ułatwia ich agregację pojawiając się w

zwiększonych ilościach na powierzchni ich błon plazmatycznych (Bennet i wsp. 2001). Nieintegrynowy kompleks czynników GPIb-IX-V pełni rolę mediatora adhezji krwinek płytkowych do miejsca uszkodzenia naczynia krwionośnego poprzez wiązanie z zaktywowanym czynnikiem von Willebranda znajdującym się w warstwie podśródbłonkowej naczyń (Alevriadou wsp. 1993). W zaktywowanych krwinkach płytkowych obserwuje się również translokację P-selektyny (GMP-140) z ziarnistości alfa na powierzchnię błony komórkowej (Stenberg i wsp. 1985) co prowadzi do zmian jej konformacji i zwiększenia zdolności do wiązania fibrynogenu (Shattil i wsp. 1985). W tych warunkach zwiększa się wiązanie trombospondyny do glikoproteiny IV (GPiV) i wiązania się czynnika von-Willebranda do kompleksu GPIb-IX-V (Michelson i wsp. 1988). Agoniści agregacji: rystocetyna, kolagen, epinefryna, ADP, kwas arachidonowy i peptyd 6 aktywujący receptor dla trombiny (TRAP-6) zwiększają zawartość P-selektyny w błonie plazmatycznej krwinek płytkowych, a przez to zdolność wiązania fibrynogenu przez kompleks GPIIb-IIIa w krwinkach płytkowych (Panzer i wsp. 2006). Najsilniejszym czynnikiem aktywującym P-selektynę jest TRAP-6. Kolagen zaś jest najslabszym aktywatorem krwinek płytkowych. Wykazano istnienie znamiennej korelacji pomiędzy zawartością P-selektyny i aktywacją integryny- $\alpha_{IIb}\beta_3$  w krwinkach płytkowych niezależnie od rodzaju użytego agonisty (Panzer i wsp. 2006).

Proces adhezji jest wynikiem kontaktu krwinek płytkowych z kolagenem poprzez czynniki von Willebranda powodującym pobudzenie GPVI i integryny  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . GPVI wiąże się z receptorem Fc łańcucha  $\gamma$  immunoglobulin na powierzchni krwinek płytkowych, a zaaktywowany przez kolagen kompleks ulega fosforylacji przez kinazy tyrozynowe (Gibbins i wsp. 1996, 1997). W wyniku tego procesu szereg cząstek sygnalizacyjnych ulega aktywacji prowadząc ostatecznie do agregacji krwinek płytkowych (Gibbins i wsp. 1998, Poole i wsp. 1997, Watson i wsp. 1998, 2001).

Niezależnie od istnienia oddzielnych dróg wewnątrzpłytkowego przekazywania sygnałów aktywowanych przez trombinę i kolagen, opisano wspólną wewnątrzkomórkową drogę sygnalizacji dla obu tych aktywatorów regulowaną przez kinazę 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3K). Enzym ten jest odpowiedzialny za syntezę pochodnych fosfatydyloinozytolu, które nie działają jako wtórne przekaźniki informacji i są nieobecne w płytkach nieaktywowanych. Natomiast poziom ich wzrasta po stymulacji płytek agonistami. Produkty reakcji PI-3K nie są substratami dla fosfolipaz, ale zahamowanie ich syntezy powoduje obniżenie odpowiedzi komórek mózgu i mięśniowych na różne bodźce (Strosznajder i wsp. 2004). PI-3K może odgrywać istotną



rolę we wzmacnianiu odpowiedzi krwinek płytkowych na czynniki aktywujące (Jackson i wsp. 2004, Resendiz i wsp. 2003, Vanhaesebroeck i wsp. 2001). Wiadomo, że istotną rolę w regulacji funkcji płytek i procesach prozakrzepowych odgrywa izoforma PI-3K klasy 1a aktywowana przez kinazy tyrozynowe (Jackson i wsp. 2005). Zwiększenie aktywacji PI-3K przez trombinę lub kolagen prowadzi do aktywacji kinazy białkowej B (PKB), która w odpowiedzi na 3-fosfatydyloinozytol (PIP<sub>3</sub>) może zwiększać odpowiedź płytek krwi poprzez wzrost uwalniania ADP (Barry i Gibbnis 2002, Kroner i wsp. 2000). W konsekwencji ADP stymuluje drogę sygnalizacyjną zależną od białek Gi, które poprzez inhibicję cyklicznej adenylanowej odpowiadają za zmniejszenie poziomu cyklicznego AMP (cAMP). Powoduje to aktywację GPIIb-IIIa, wiązanie fibrynogenu i wzrost agregacji płytek (Barry i Gibbnis, 2002).

W trakcie aktywacji płytki uwalniają czynniki stymulujące proces krzepnięcia osoczkowego, czynniki wzrostu niezbędne do obkurczania i naprawy uszkodzonego naczynia oraz agonistów agregacji: tromboksan A<sub>2</sub>, ADP i ATP (Cattaneo i wsp. 2000, Hechler i wsp. 2005).

W ostatnich latach wykazano, że pobudzenie odpowiednich receptorów powierzchniowych krwinek płytkowych przez trombinę, ADP, tromboksan A<sub>2</sub> lub kolagen jest związane ze wzrostem wewnątrzpłytkowego stężenia Ca<sup>2+</sup> i DAG, które reagując z kompleksem białek CalDAG-GEFI zwiększają agregację płytek i tworzenie skrzepu (Crittenden i wsp. 2004).

#### 2.4. Nukleotydy w krwinkach płytkowych

Krwinki płytkowe zawierają nukleotydy: adeninowe i guanidynowe i hipoksantyny, oraz nukleotydy pirymidynowe zawierające uracyl i cytydynę (White, 2002). Nukleotydy adeninowe stanowią największą pulę nukleotydów, która odgrywa zasadniczą rolę w modyfikacji funkcji krwinek płytkowych. ATP dostarcza energii niezbędnej do utrzymania kształtu, procesów adhezji, akumulacji i agregacji, uwalniania substancji zmagazynowanych w ziarnistościach krwinek płytkowych, retrakcji skrzepu, transportu przez błonę mitochondrialną oraz pobierania serotoniny (White, 2002).

ADP uwalniany z ziarnistości gęstych jest jednym z agonistów krwinek płytkowych aktywujących procesy hemostazy. Sekrecja ADP zmagazynowanego w ziarnistościach gęstych w trakcie aktywacji i agregacji krwinek płytkowych jest skorelowana z jednoczesnym przyśpieszeniem syntezy ATP (Akkerman i Holmsen, 1981). Zaobserwowano, że w trakcie całkowitej agregacji stymulowanej kolagenem, trombiną

lub ADP krwinki płytkowe zużywają blisko połowę całkowitej ilości ATP, w tym 10% tej puli zużywa się w trakcie kompletnej sekrecji ziarnistości gęstych, a prawie cała zawartość płytkowego ATP zużywa się podczas sekrecji ziarnistości alfa i ziarnistości zawierających kwaśne hydrolazy (Verhoeven i wsp. 1986).

Krwinki płytkowe posiadają w błonach komórkowych receptory purynowe P2Y1 i P2Y12 aktywowane przez ADP; sprzężone odpowiednio z białkami Gq i Gi. Z kolei receptory P2X1 mają właściwości kanału jonowego, a ich naturalnym agonistą jest ATP (Ralevic i wsp. 1998). Pobudzenie receptorów P2Y1 aktywuje białka Gαq i fosfolipazę C-β2, co prowadzi do powstawania wtórnych przekaźników informacji IP3 i DAG. IP3 zwiększa mobilizację jonów wapniowych z retikulum endoplazmatycznego powodując zmiany kształtu krwinek płytkowych i indukuje przejściową agregację w odpowiedzi na ADP oraz kolagen (Leon, 1999, Mangin i wsp. 2004). ADP jest naturalnym agonistą, zaś ATP antagonistą dla receptora błonowego P2Y12, (Kauffenstein i wsp. 2004, Bodor i wsp. 2003). Receptor ten jest sprzężony z białkiem Gi, którego aktywacja hamuje aktywność cykazy adenylanowej powodując obniżenie cAMP i podwyższenie stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w krwinkach płytkowych. Powoduje to zwiększenie zdolności krwinek płytkowych do agregacji w obecności kolagenu, trombiny, tromboksanu A2, adrenaliny, serotoniny lub kompleksów immunologicznych (Hechler i wsp. 2005). Dzięki temu ADP nasila sekrecję zawartości ziarnistości płytkowych i przez to bierze udział w procesie agregacji płytek, powstawaniu skrzepu i jego stabilizacji (Cattaneo i wsp. 2000).

Pobudzenie receptora P2X1 zwiększa napływ jonów wapniowych z przestrzeni pozakomórkowej oraz powoduje odwracalną zmianę kształtu krwinek płytkowych, (Rolf i wsp. 2001). Sam ATP poprzez aktywację receptora P2X1 nie wywołuje agregacji. Wiadomo jednak, że jest dodatnim modulatorem agregacji wywołanej kolagenem lub stresem mechanicznym powstającym w naczyniach włosowatych (Oury i wsp. 2001, Vial i wsp. 2002). Istotne znaczenie receptorów P2Y i P2X dla funkcji krwinek płytkowych zostało potwierdzone przez zastosowanie ich antagonistów (Hechler i wsp. 2005, Jacobson i wsp. 2005). Suramina jest niespecyficznym antagonistą zarówno receptorów P2X i P2Y stosowanym w badaniach *in vitro* funkcji płytek (Park i Hourani, 1999). Natomiast tiklopidyna i clopidogrel są selektywnymi antagonistami receptora P2Y12 stosowanymi jako leki przeciwplatekcyjne w prewencji powikłań serowo-naczyniowych u pacjentów z cukrzycą i innymi chorobami zwiększającymi ryzyko wystąpienia miażdżycy (CAPRIE Steering Committee, 1996).

Wydaje się, że zastosowanie antagonistów receptorów purynowych w preparatach krwinek płytkowych *in vitro* pomogłoby odpowiedzieć na pytanie czy i w jakim stopniu ATP/ADP odpowiada za ich nadmierną aktywację w przebiegu cukrzycy.

## 2.5. Transport glukozy

Glukoza jest podstawowym substratem energetycznym krwinek płytkowych. Głównym transporterem występującym w krwinkach płytkowych jest transporter typu 3, niezależny od insuliny (Glut3), (Craik i wsp. 1995, Heijnen i wsp. 1997). W warunkach spoczynkowych od 75 do 85% tego transportera jest zlokalizowana wewnątrzkomórkowo w ziarnistościach alfa (Craik i wsp. 1995, Heijnen i wsp. 1997). Po aktywacji krwinek płytkowych trombiną dochodzi do fuzji ziarnistości alfa z błoną plazmatyczną i w konsekwencji do dwukrotnego wzrostu napływu glukozy do wnętrza krwinek płytkowych (Heijnen i wsp. 1997, Sorbara i wsp. 1997). Glut3 występuje w neuronach, śródbłonku naczyń krwionośnych, fibroblastach, granulocytach, monocytach, mięśniach szkieletowych, trzustce i mięśniu sercowym. Obecny jest również w komórkach łożyska, w tym w szczególnie aktywnych metabolicznie cytotrofoblastach (Illsley i wsp. 1998, Stuart i wsp. 2001). Glut3 charakteryzuje się niską wartością  $K_m$  dla glukozy (1.5-2.8 mM) (Heijnen i wsp. 1997, Sorbara i wsp. 1997). Dlatego zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, receptor funkcjonuje w stanie nasycenia, a napływ glukozy do krwinek płytkowych jest regulowany przez zmiany gęstości receptorów Glut3 w błonie komórkowej. Krwinki płytkowe posiadają również minimalne ilości transportera Glut1 o niskim powinowactwie do glukozy ( $K_m$  29 mM) (Heijnen i wsp. 1997, Hruz i wsp. 2001).

Zwiększony metabolizm energetyczny w krążących zaktywowanych krwinkach płytkowych odgrywa istotną rolę w tworzeniu i retrakcji skrzepu. Trombina prowadzi do wzrostu napływu glukozy do wnętrza krwinek płytkowych poprzez zwiększenie gęstości receptorów Glut3 w ich błonach plazmatycznych (Heijnen i wsp. 1997). Aktywacja płytek przez ADP powoduje jedynie zmianę kształtu krwinek płytkowych, centralizację ziarnistości alfa i tworzenie pseudopodii. ADP nie zmienia dystrybucji Glut3 w płytkach co wyjaśnia brak wpływu tego nukleotydu na wychwyt glukozy (Heijnen i wsp. 1997).

Szybkość napływu glukozy do wnętrza krwinek płytkowych jest regulowana przez kinazę białkową B (PKB) (Ferreira i wsp. 2005). Przy niskich stężeniach glukozy (0.5mM) insulina i trombina stymulują napływ glukozy do wnętrza krwinek

płytkowych, poprzez aktywację PKB. Z drugiej strony przy fizjologicznych około 5mM stężeniach glukozy, insulina staje się inhibitorem wywołanej przez trombinę aktywacji jej napływu do wnętrza płytek (Ferreira i wsp. 2005). Pozwala to przypuszczać, że przy bezwzględnym lub względnym niedoborze insuliny napływ glukozy do krwinek płytkowych może być zwiększony. Wyjaśniałoby to przyspieszenie metabolizmu pirogronianu i zwiększenie syntezy i dostępności acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej krwinek płytkowych w cukrzycy (Skibowska i wsp. 2003). Dzięki temu wzrastałaby synteza czynnika aktywującego płytki (PAF) i innych lipidowych aktywatorów funkcji płytek (Skibowska i wsp. 2003). W konsekwencji, hiperglikemia mogłaby być przyczyną zwiększonej reaktywności płytek obserwowanej u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 (Bresler i Gumprecht, 1993, Kwaan i wsp. 1992, Skibowska i wsp. 2003, Winocour i wsp. 1992). Krwinki płytkowe ssaków mają również zdolność adaptacji do hiperglikemii poprzez zwiększenie transportu glukozy i wzrost syntezy ATP w procesie glikolizy i cyklu kwasów trójkarboksylowych (Bashan i wsp. 1993). Dlatego wydaje się, że również proces nadmiernej aktywacji krwinek płytkowych u ludzi wymaga większego zużycia energii i zależy od zwiększonego napływu glukozy do wnętrza płytek krwi poprzez wzrost gęstości transporterów Glut3 w ich błonach plazmatycznych. Krwinki płytkowe osób z cukrzycą wydają się być odpowiednim modelem do weryfikacji tej hipotezy.

## 2.6. Tlenek azotu

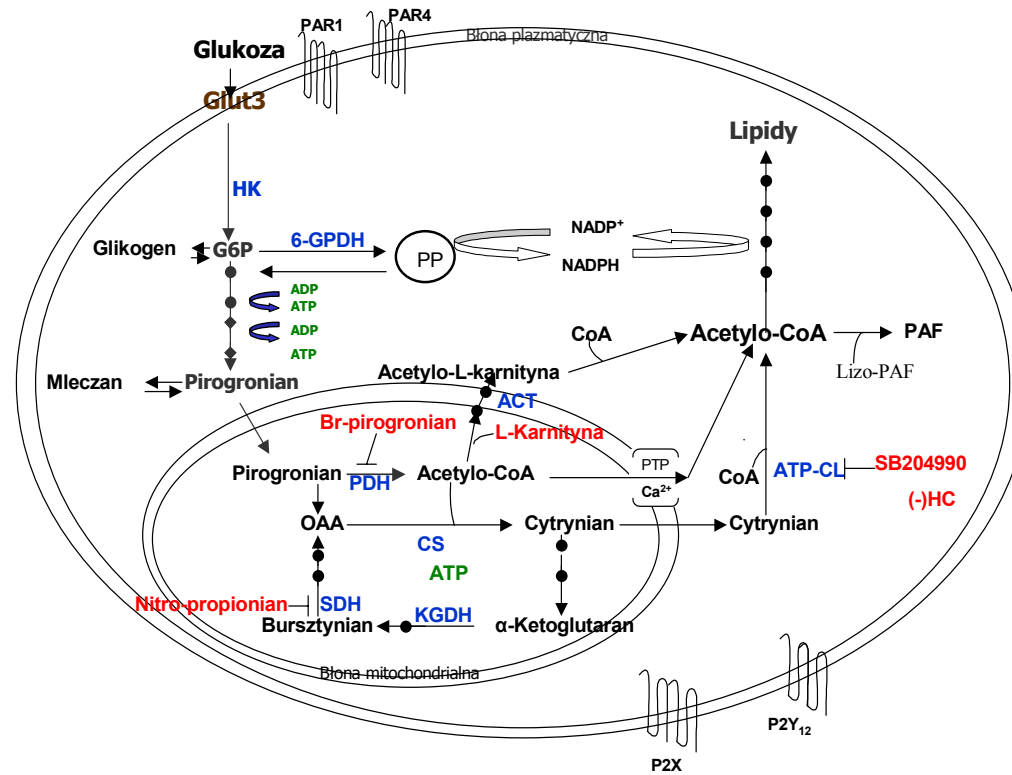
Tlenek azotu (NO) odgrywa kluczową rolę jako czynnik zmniejszający napięcie mięśni gładkich. Bierze on udział w procesach neuroprzekaznictwa w układzie nerwowym, odpowiedzi immunologicznej i regulacji funkcji krwinek płytkowych (Moncada i wsp. 1991, Radomski i wsp. 1991, Szabo i wsp. 1995). NO jest wydzielany przez komórki śródbłonna naczyniowego i zaktywowane makrofagi (Moncada i wsp. 1991, Titheradge i wsp. 1999) oraz przez płytki zarówno w stanie spoczynku jak i aktywacji (Lantoiné i wsp. 1995, Mehta i wsp. 1995, Radomski i wsp. 1996). Wiadomo, że NO jest silnym inhibitorem adhezji i agregacji krwinek płytkowych (Radomski i wsp. 1996, Sogo i wsp. 2000). Mechanizm jego działania polega na aktywacji cytoplazmatycznej cyklazy guanylanowej (Schmidt i wsp. 1993), która poprzez zwiększenie produkcji cyklicznego GMP (cGMP) powoduje zmniejszenie mobilizacji jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego do przedziału cytoplazmatycznego i hamuje zależną od agonistów aktywację krwinek płytkowych (Negrescu i wsp. 1990). NO zmniejsza utlenianie kwasu

arachidonowego (Wirthumer-Hoche, 1984) i zmniejsza aktywność kinazy 3-fosfoinozytolu co w konsekwencji ułatwia dysocjację fibrynogenu od glikoproteiny IIb-IIIa (Pigazzi i wsp. 1999). Hamuje on również aktywność fosfolipazy A<sub>2</sub> (Radomski i Moncada, 1993). Wysokie stężenia NO mogą hamować aktywność łańcucha oddechowego poprzez inhibicję aktywności oksydazy cytochromowej (kompleks IV), a w bardzo dużych stężeniach kompleksy I, II i III poprzez nitrozylację lub utlenianie białek i enzymów zawierających grupy tiolowe i centra żelazowo-siarkowe (Brown i Borutaite. 1999, Tomasiak i wsp. 2004). Niezależnie od aktywacji syntezy cGMP, wysokie stężenie NO hamuje aktywność cyklu kwasów trójkarboksylowych poprzez inhibicję akonitazy (Tomasiak i wsp. 2004). Hamujący wpływ NO na agregację krwinek płytkowych poprzez zahamowanie sekrecji zawartości ziarnistości wynikał z inhibicji fosforylacji oksydacyjnej (Tomasiak i wsp. 2004). Zaburzenie produkcji endogennego tlenu azotu przez krwinki płytkowe może być przyczyną zaburzeń prozakrzepowych w wielu jednostkach chorobowych (Freedman i Loscalzo, 2003).

## 2.7. Metabolizm energetyczny krwinek płytkowych

Podstawowym substratem energetycznym dla krwinek płytkowych jest glukoza. Jej transport z przestrzeni pozakomórkowej odbywa się przez transporter Glut3 (Craik i wsp. 1995, Heijnen i wsp. 1997, Leoncini i Maresca, 1984). Transport glukozy jest częściowo uzależniony od jej szybkiej przemiany wewnątrz komórki do glukozy-6-fosforanu co zwiększa jej gradient przez błonowy (Kotelba-Witkowska, 1984). Część glukozy jest akumulowana w postaci glikogenu i stanowi zapasowe źródło energii dla krwinek płytkowych. Szybkość transportu glukozy do krwinek płytkowych zależy od jej stężenia w osoczu i determinuje resyntezę puli ATP niezbędnej do ich agregacji i sekrecji z ziarnistości wydzielniczych (Akkerman i wsp. 1978). Około 50% glukozy ulega przemianie do kwasu mlekowego, który jest uwalniany do przestrzeni pozakomórkowej (Kotelba-Witkowska, 1984). W warunkach tlenowych około 40% glukozy jest zużywane głównie do syntezy glikogenu i w mniejszym stopniu do produkcji aminokwasów i lipidów. Różne czynniki wywołujące agregację krwinek płytkowych powodują aktywację glikolizy i akumulację kwasu mlekowego poprzez aktywację fosfofruktokinazy (Kotelba-Witkowska, 1984). Wzrost zużycia glukozy i produkcji CO<sub>2</sub> następował również po aktywacji krwinek płytkowych kwasem arachidonowym (Leoncini i Maresca, 1987). Aktywacja krwinek płytkowych przez ADP

Ryc. 1. Drogi metabolizmu glukozy i acetylo-CoA w krwinkach płytkowych.



HK-heksokinaza, PDH-dehydrogenaza pirogronianowa, ATP-CL-liaza ATP cytrynianowa, ACT-acylo-transferaza karnitynowa, PTP-kanaly anionowe o wysokiej przewodności zależne od Ca<sup>2+</sup> (ang.permeability transition pores), OAA- szczawiooctan, CS-syntaza cytrynianowa, αKGDH-dehydrogenaza α-ketoglutaranowa, SDH-dehydrogenaza bursztynianowa, 6-GPDH-dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, PP-szlak pentozomono-fosforanowy, (-)HC(-)Hydroksycytrynian,

trombinę zwiększa również aktywność cyklu pentozomonofosforanowego. Wykazano, że 12-25% glukozy w krwince płytkowej jest metabolizowane w cyklu pentozomonofosforanowym (Kotelba-Witkowska, 1984). Ta droga metaboliczna dostarcza NADPH<sub>2</sub> do syntezy lipidów oraz redukcji glutationu. Zredukowany glutation wspólnie z dysmutazą ponadtlenkową i katalazą stanowi układ chroniący krwinki płytkowe przed szkodliwym wpływem wolnych rodników tlenowych (Kotelba-Witkowska, 1984).

Krwinki płytkowe posiadają stosunkowo niewiele (3-10) mitochondriów. Jednakże w reakcji utleniania pirogronianu przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej oraz w cyklu kwasów trójkarboksylowych i sprzężonym z nimi łańcuchem oddechowym, jest syntetyzowane 50% płytkowego ATP (Ryc. 1) (Brown i Borutaite. 1999, Holmsen, 1981, Niessner i Beutler, 1974). Tak jak w większości komórek glikoliza i metabolizm mitochondrialny w krwinkach płytkowych są ze sobą ściśle powiązane co jest potwierdzone istnieniem w nich efektu Pasteura (Akkerman, 1978, Guppy i wsp. 1995, Niu i wsp. 1996). Zablockowanie łańcucha oddechowego powodowało zwiększenie aktywności glikolitycznej płytek mierzonej szybkością akumulacji mleczanu (Guppy i wsp. 1995). Wykazano również wzrost produkcji mleczanu i metabolizmu tlenowego po aktywacji krwinek płytkowych trombiną lub kolagenem (Akkerman i Holmsen, 1981, Niu i wsp. 1996, Tomasiak i wsp. 2004). Ilość ATP zsyntetyzowanego w cyklu glikolitycznym po blokadzie cyklu kwasów trójkarboksylowych wydaje się być wystarczająca dla agregacji wywołanej trombiną (Tomasiak i wsp. 2004). Z drugiej strony gwałtowny wzrost zużycia tlenu przez krwinki płytkowe po aktywacji trombiną wiąże się z aktywacją cyklu kwasów trójkarboksylowych i fosforylacji oksydacyjnej, dostarczających w tych warunkach około połowy płytkowego ATP (Kotelba-Witkowska, 1984). ATP niezbędny do reakcji uwalniania zawartości ziarnistości płytkowych z aktywowanych płytek może być dostarczony zarówno przez fosforylację oksydacyjną jak i przez glikolizę, a część tlenu może być zużyta do syntezy *de novo* prostaglandyn. Podstawowym substratem energetycznym w mitochondriach płytek krwi jest pirogronian, który jest metabolizowany do acetylo-CoA przez dehydrogenazę pirogronianową (Ryc.1). Spadek zawartości mitochondrialnego acetylo-CoA w krwinkach płytkowych po stymulacji trombiną może być spowodowany jego zwiększonym zużyciem w procesach aktywacji krwinek płytkowych (Skibowska i wsp. 2003). Świadczy o tym korelacja pomiędzy zawartością acetylo-CoA, a stopniem aktywacji krwinek płytkowych (Skibowska i wsp. 2003).

## 2.8. Modyfikacja metabolizmu i funkcji płytek

### 2.8.1. L-karnityna

L-karnityna jest kofaktorem przemian energetycznych komórek mięśni szkieletowych i serca. Bierze udział w pośrednim transporcie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przez błony mitochondrialne (Ramsay i wsp. 2001). Enzymem zaangażowanym w ten proces jest acylo-transferaza karnitynowa I, która katalizuje reakcję syntezy acylo-karnityny w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. W dalszym etapie zachodzącym na wewnętrznej powierzchni błony mitochondrialnej następuje odtworzenie acylo-CoA z udziałem translokazy acylo-karnitynowej i acylo-transferazy karnitynowej II (Ramsay i wsp. 2001). Dzięki temu kompleksowi enzymatycznemu możliwy jest transport kwasów tłuszczowych do wnętrza mitochondrium, gdzie są one utleniane w procesie beta-oksydacji. L-karnityna bierze również udział w transporcie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, jak również acetylo-CoA z mitochondrów do cytoplazmy (Ryc.1) (Bremer, 1983). Wydaje się, że L-karnityna ma również wpływ na funkcję krwinek płytkowych. Wykazano, że przyjmowanie propionylo-L-karnityny zmniejszało reaktywność krwinek płytkowych u osób z cukrzycą oraz hamowało utlenianie kwasu arachidonowego i syntezę reaktywnych form tlenu (Pignatelli i wsp. 2003). Podawanie L-karnityny ludziom hamowało wbudowywanie kwasu arachidonowego do fosfolipidów, zmniejszało agregację zależną od kolagenu, tworzenie tromboksanu  $A_2$ , mobilizację  $Ca^{2+}$ , jak również syntezę rodników ponadtlennokowych oraz aktywność kinazy białkowej C w krwinkach płytkowych *in vitro* (Pignatelli i wsp. 2003). Według innych źródeł, propionylo-L-karnityna zmniejszała aktywność krwinek płytkowych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* przez inhibicję syntezy czynnika aktywującego płytki (PAF) (Triggiani i wsp. 1999). Jest to trudne do wyjaśnienia, gdyż wewnątrzkomórkowa hydroliza propionylo-L-karnityny powoduje powstawanie L-karnityny, która zwiększa przepływ metaboliczny przez etap acetylotransferazy karnitynowej. Oczekiwanym efektem byłoby więc zwiększenie, a nie zmniejszenie zawartości acetylo-CoA w komórkach tak jak wykazano to w mózgu szczura (Rickey i wsp. 1992). Hipoteza ta, nie została jednak zweryfikowana eksperymentalnie w przypadku krwinek płytkowych. Dodatkowo, inne prace nie potwierdziły hamującego wpływu propionylo-L-karnityny na syntezę kwasu arachidonowego (Triggiani i wsp. 1999). Co więcej obserwowano hipertriglicydemie u pacjentów z cukrzycą typu 2, którym podawano L-karnitynę (Rahbar i wsp. 2005). Z drugiej strony, opisano zmniejszenie zdolności krwinek płytkowych do agregacji po podaniu inhibitorów acylo-transferazy karnitynowej I takich jak perhexylina, amiodaron czy kwas 2-tetradecylo-



glicydowy (Ishikura i wsp. 1992, Willoughby i wsp. 1998). Autorzy sugerują, że wzrost metabolizmu acylo-karnityny może raczej zwiększać, niż zmniejszać aktywność krwinek płytkowych (Willoughby i wsp. 1998). Tak więc przedstawione wyżej dane dotyczące wpływu pochodnych L-karnityny na funkcję krwinek płytkowych są sprzeczne. Brak jest także informacji dotyczących wpływu tego związku na metabolizm energetyczny płytek. Wskazuje to na potrzebę przeprowadzenia odpowiednich badań weryfikujących hipotezę dotyczącą wpływu L-karnityny na krwinki płytkowe, w szczególności u pacjentów z cukrzycą.

### 2.8.2. Inhibitory przemian energetycznych a funkcja krwinek płytkowych

Produkcja energii w krwinkach płytkowych ma istotne znaczenie dla ich funkcji. ATP stanowi źródło energii i jest substratem do procesów fosforylacji białek oraz modyfikuje aktywność receptorów odpowiedzialnych za aktywację płytek. Dlatego inhibicja utleniania pirogronianu w cyklu kwasów trójkarboksylowych i/lub fosforylacji oksydacyjnej może hamować funkcję krwinek płytkowych.

Zastosowanie inhibitorów poszczególnych etapów przemian energetycznych może być pomocne w weryfikacji hipotezy, że zwiększona reaktywność krwinek płytkowych w cukrzycy wynika z aktywacji przepływu reszt acetylowych przez cykl kwasów trójkarboksylowych. 3-Bromopirogronian (3-BrPG) jest inhibitorem dehydrogenazy pirogronianowej obniżającym poziom acetylo-CoA w mózgu (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Burton i wsp. 1995, Dutschke i wsp. 1994). Dlatego zastosowanie 3-BrPG jako inhibitora dehydrogenazy pirogronianowej pomogłoby ustalić czy zwiększona aktywność tego enzymu w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą może odgrywać rolę w nadmiernej aktywacji krwinek płytkowych poprzez zmiany zawartości acetylo-CoA oraz ATP/ADP (Ryc.1).

Nitropropionian (3-NPA) jest inhibitorem dehydrogenazy bursztynianowej (kompleksu II łańcucha oddechowego) (Coles i wsp. 1979). Wiadomo, że hamuje on metabolizm tlenowy i produkcję ATP, a w konsekwencji prowadzi do depolaryzacji błon mitochondrialnych neuronów (Beal i wsp. 1993, Greene i wsp. 1998, Zeevalk i wsp. 1995). Powoduje to indukcję stresu oksydacyjnego, tworzenie rodników tlenowych i nitrozylowych w mózgu szczurów (Lipton-Rosenberg i wsp. 1994, Szulz i wsp. 1995). Nie jest znany wpływ tego inhibitora na funkcję płytek. Zbadanie wpływu nitropropionianu na aktywność płytek oraz zawartość ATP/ADP i acetylo-CoA umożliwiłoby oszacowanie roli kompleksu II łańcucha oddechowego w aktywacji

krwinek płytkowych u osób zdrowych i chorych na cukrzycę (Ryc. 1).

(-) Hydroksycytrynian ((-)HC) jest odwracalnym, a SB-204990 (i jego lakton SB-201076) nieodwracalnym inhibitorem liazy ATP-cytrynianowej (Pearce i wsp. 1998) (Ryc. 1). Stwierdzono, że (-)HC powodował wzrost akumulacji cytrynianu i spadek poziomu acetylo-CoA we frakcji cytoplazmatycznej zakończeń nerwowych (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Szutowicz i wsp. 1981). Jednocześnie nie obserwowano wpływu tego inhibitora na stężenie acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej. Efektem działania *in vivo* (-)HC był spadek syntezy zarówno cholesterolu, jak i triglicerydów oraz wzrost aktywności receptora LDL (Pearce i wsp. 1998). Badania przeprowadzone z użyciem SB-204990 wykazały spadek syntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych w komórkach wątroby oraz hipolipidemię u zwierząt doświadczalnych (Pearce i wsp. 1998). Można więc przypuszczać, że również w krwinkach płytkowych inhibitory liazy ATP-cytrynianowej mogą wpływać na syntezę kwasów tłuszczowych, fosfolipidów i lipidowych czynników aktywacji płytek krwi oraz związaną z nimi funkcję płytek krwi.

## 2.9. Płytki a cukrzyca

Istnieje wiele danych wskazujących na nadmierną aktywność krwinek płytkowych u osób z cukrzycą. Wykazano, że wzrost spontanicznej aktywacji płytek występuje u pacjentów z cukrzycą bez zmian naczyniowych (Vericel i wsp. 2004). Sugeruje to, że ta nadmierna aktywność wynika nie tylko z uszkodzeń naczyń krwionośnych, ale również ze zmian w strukturze i metabolizmie samych krwinek płytkowych u osób z cukrzycą (Vericel i wsp. 2004). U pacjentów z cukrzycą obserwowano wzrost spontanicznej i indukowanej agonistami agregacji krwinek płytkowych, która nie była korygowana przez kontrolę stanu glikemii (Collins i wsp. 2004). Jednocześnie w obu typach cukrzycy, wzrastała populacja krwinek płytkowych posiadających wysoką gęstość zależnych od aktywacji białek adhezyjnych: GPIIb/IIIa, trombospondyny i P-selektyny (Keating i wsp. 2004). Nadmierna reaktywność krwinek płytkowych może być spowodowana zwiększoną gęstością błonowych receptorów dla glikoprotein adhezyjnych, zwiększeniem wiązania fibrynogenu, zmniejszoną płynnością błon plazmatycznych, aktywacją przemiany kwasu arachidonowego do tromboksanu  $A_2$  i zwiększonym obrotem fosfatydyloinozytolu. Powodowałoby to zwiększenie poziomu IP<sub>3</sub>, uwalniania  $Ca^{2+}$  z retikulum endoplazmatycznego i fosforylacji białek (Winocour, 1994). Wzrost mobilizacji jonów wapniowych i agregacji krwinek płytkowych osób chorych na cukrzycę obserwowano zarówno po aktywacji płytek krwi przez trombinę

jak i przez ADP (Rosado i wsp. 2002). Zmianom tym towarzyszył wzrost akumulacji wolnych rodników tlenowych w płytkach (Redondo i wsp. 2005, Rosado i wsp. 2002). Może to wynikać ze zwiększonej produkcji  $H_2O_2$  albo z obniżonego poziomu przeciwutleniaczy (Colwell i wsp. 2003). Dlatego uważa się, że podawanie antyoksydantów może redukować ryzyko choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego u pacjentów z cukrzycą (Colwell i wsp. 2003). Aktywowane krwinki płytkowe posiadają na swojej powierzchni antygen CD40L należący do rodziny czynników martwicy nowotworów i posiadający właściwości prozapalne (Henn i wsp. 1998). Wykazano wzrost zawartości rozpuszczalnego CD40L w osoczu osób z cukrzycą typu 2 (Lim i wsp. 2004). Istnieje dodatnia korelacja pomiędzy gęstością receptora CD36 należącego do klasy B receptorów zmiatających (scavenger receptors, SR), a zwiększeniem powikłań naczyniowych w cukrzycy. CD36 jest glikoproteiną błonową występującą na powierzchni wielu komórek takich jak płytki krwi, komórki śródbłonna naczyniowego, monocyty, makrofagi czy adipocyty dla której ligandami są utlenione cząstki LDL, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kolagen, trombospondyna 1, utlenione fosfolipidy oraz AGEs (Febbraio i wsp. 2001, Nicholson, 2004). Te właściwości antygeny CD36 sugerują jego udział w patomechanizmie rozwoju zmian miażdżycowych.

Wydaje się, że zwiększona reaktywność krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą wynika ze zmienionego profilu lipidowego zarówno w osoczu krwi jak i strukturze ich błon komórkowych oraz z hiperglikemii. Zaburzony metabolizm węglowodanów i lipidów powoduje zmiany płynności błon i gęstości receptorów w błonach komórkowych krwinek płytkowych (Watała i wsp. 1996, 1998). Wykazywano istnienie związku pomiędzy modyfikacją oksydacyjną białek płytkowych przez glukozę i zmniejszoną płynnością ich błon komórkowych w cukrzycy (Watała i wsp. 1996, Winocour i wsp. 1992). Prowadzone od kilku lat intensywne leczenie hiperlipidemii u osób z cukrzycą może znacznie zmniejszyć udział komponenty lipidowej w powstawaniu angiopatii cukrzycowej.

Hiperglikemia zwiększa aktywację GP IIb/IIIa, zawartość P-selektyny oraz reaktywność krwinek płytkowych (Keating i wsp. 2003). W grupie pacjentów z cukrzycą obserwuje się zmniejszenie wrażliwości płytek na NO, prostacykliny, zmniejszoną aktywność fibrynolityczną układu krzepnięcia i zwiększoną aktywność czynnika von Willebranda (Nie i wsp. 2006). Dodatkowo hiperglikemia, może wywoływać wzrost przemiany glukozy do acetylo-CoA w krwinkach płytkowych, co mogłoby zwiększać syntezę czynnika aktywującego płytki (PAF). Również wzrost aktywności heksokinazy w

krwinkach płytkowych u osób z cukrzycą może przyspieszać metabolizm glukozy (Skibowska i wsp. 2003). Z drugiej strony inne badania wykazały spadek aktywności tego enzymu oraz zmniejszenie napływu glukozy do krwinek płytkowych osób z cukrzycą typu 1 zarówno z wyrównanymi i niewyrównanymi parametrami stanu glikemii (Leoncini i wsp. 1987). Jednocześnie obserwowano wzrost syntezy i zawartości glikogenu w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą typu 1. Sugeruje to, że zarówno glukoza pochodząca z glikogenolizy jak i transportowana z przestrzeni pozakomórkowej może być istotnym substratem energetycznym dla krwinek płytkowych w cukrzycy. Zwiększenie przemiany glukozy pozostaje w zgodzie z obserwowanym wzrostem zawartości acetylo-CoA w płytkach pacjentów z cukrzycą (Skibowska i wsp. 2003).

W badaniach wykonanych na szczurach z cukrzycą streptozotocynową wykazano wzrost aktywności NTPD-azy (ATP difosfohydrolazy) oraz 5'-nukleotydazy- enzymów odpowiedzialnych za rozkład ATP i AMP w krwinkach płytkowych (Lunkes i wsp. 2004). Z drugiej strony istnieje hipoteza, że krwinki płytkowe w cukrzycy wykazują zmniejszoną reaktywność z powodu zwiększonego zaangażowania w procesach prozakrzepowych. Niektóre prace wykazują, że krwinki płytkowe osób z cukrzycą typu 1 i 2 wykazują słabszą odpowiedź na trombinę oraz zmniejszoną zawartość podjednostki  $\beta_3$  receptora GPIIb-IIIa dla fibrynogenu (Watała i wsp. 1996).

Z drugiej strony krwinki płytkowe osób z cukrzycą mogą być aktywowane nawet przy braku uszkodzenia śródbłonna naczyniowego o czym świadczy zwiększony poziom receptora dla glikoproteiny IIb/IIIa w ich błonach plazmatycznych. W konsekwencji płytki cukrzycowe mogą być pobudzone nawet przez podprogowe stężenia agonistów stając się ostatecznie mniej reaktywne. Może to stymulować trombopoezę i wyrzut świeżych wysoce reaktywnych krwinek płytkowych ze szpiku kostnego (Watała i wsp. 1991). Zaobserwowano również wzrost liczby krwinek płytkowych oraz wzrost płatowości jądra komórkowego megakariocytów u osób z cukrzycą powikłaną zmianami naczyniowymi (Brown i wsp. 1997). Przedstawiona hipoteza wyjaśniałaby zwiększenie frakcji płytek o bardzo małej i dużej objętości u osób z cukrzycą. Krwinki płytkowe o dużej objętości i zwiększonej gęstości są uważane za młodsze i bardziej reaktywne. Natomiast subpopulację o małych rozmiarach mogą stanowić płytki o obniżonej reaktywności i dłuższym czasie przeżycia w krwiobiegu, zawierające mniejszą ilość ziarnistości wskutek ich zużycia w incydentach zakrzepowych (Watała i wsp. 1996). Inni badacze zaobserwowali wzrost średniej objętości krwinek płytkowych

u osób z cukrzycą typu 2 (Hekimsoy i wsp. 2004). Co więcej objętość ta była większa u pacjentów z cukrzycą powikłaną mikroangiopatią (retinopatią czy nefropatią) (Papanas i wsp. 2004). Tak rozbieżne wyniki badań mogą wynikać z różnego nasilenia i dynamiki zmian procesów niszczenia i odnowy krwinek płytkowych w poszczególnych grupach chorych.

Sugeruje się również, że zwiększona reaktywność krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą typu 2 może wiązać się z brakiem odpowiedzi na insulinę oraz zwiększoną aktywacją receptorów purynowych P2Y<sub>12</sub> przez ADP (Ferreira i wsp. 2006).

Zwiększonej reaktywności płytek krwi w cukrzycy towarzyszy wzrost zawartości we krwi pacjentów mikrocząstek płytkowych (ang. Platelet Microparticles, PMSs). Są to pęcherzyki o średnicy mniejszej niż 1µm, które są uwalniane ze zaktywowanych krwinek płytkowych. Występują w nich antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla całych płytek takie jak: GP I<sub>IIb</sub>-III<sub>a</sub>, GPIX, P-selektyna oraz fosfolipidowy czynnik aktywujący płytki (PAF). Postuluje się, że biorą one udział w zainicjowanym przez płytki procesie adhezji. Mogą one aktywować procesy zapalne, prozakrzepowe, angiogenezę oraz powstawanie zmian miażdżycowych (Gilbert i wsp. 1991, Nomura i wsp. 2001, Tan i wsp. 2005). Zwiększoną liczbę mikrocząstek płytkowych w szczególności u osób z klinicznie potwierdzoną miażdżycą obserwowano w cukrzycy typu 2 (Tan i wsp. 2005).

Przedstawione dane wykazują, że zaburzenia krzepnięcia w cukrzycy mogą wynikać ze zmian patologicznych w obrębie każdego z układów uczestniczących w tym procesie tj. osoczonego, naczyniowego i płytkowego. Fakt, że nadmierna aktywacja płytek powstaje już we wczesnych stadiach cukrzycy niezależnie od zmian naczyniowych skłania do prób identyfikacji zaburzeń ich metabolizmu, jako istotnej przyczyny koagulopatii. Można przypuszczać, że hiperglikemia cukrzycowa może wywołać różnego typu zaburzenia metabolizmu energetycznego zarówno w tkankach insulinozależnych jak i komórkach insulino-niezależnych, do których zaliczane są krwinki płytkowe. Poprzednie nasze badania wykazały, że zmiany poziomu acetylo-CoA, podstawowego substratu cyklu kwasów trójkarboksylowych w płytkach krwi, korelują ze zmianami w funkcji płytek pacjentów z cukrzycą (Skibowska i wsp. 2003). Można więc przypuszczać, że szybkość syntezy ATP/ADP i ich akumulacji w ziarnistościach wydzielniczych w płytkach pacjentów z cukrzycą również może zależeć od wydajności zużycia glukozy oraz syntezy/poziomu acetylo-CoA w ich przedziałach: mitochondrialnym i cytoplazmatycznym. Dlatego celem pracy było wykazanie, który(e)

z etapów metabolizmu energetycznego jest odpowiedzialny za nadmierną aktywację płytek w przebiegu cukrzycy. Badania wpływu inhibitorów i aktywatorów różnych etapów metabolizmu energetycznego na podstawowe parametry funkcji płytek mogą dostarczyć nowych danych dotyczących roli acetylo-CoA i ATP/ADP w regulacji funkcji krwinek płytkowych w cukrzycy.

### **3. CEL PRACY**

Celem pracy była weryfikacja hipotezy sugerującej, że przewlekła hiperglikemia w cukrzycy może powodować nadmierną aktywację płytek krwi poprzez modyfikację metabolizmu acetylo-CoA i dystrybucji ATP i ADP.

W tym celu:

1. Przeprowadzono identyfikację dróg metabolizmu acetylo-CoA, których aktywacja może wiązać się ze zwiększoną reaktywnością krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą.
2. Zbadano współzależności między pozapłytkowymi parametrami kontroli glikemii w osoczu, a parametrami metabolizmu i funkcji płytek krwi w cukrzycy.

## 4. MATERIAŁY I METODY

### 4.1. Grupy doświadczalne

Badania przeprowadzono na grupie osób z cukrzycą typu 1 i 2 skierowanych do Laboratorium z Centrum Diabetologicznego ACK AMG Nr 1.

Badania prowadzono na następujących grupach:

59 pacjentów z cukrzycą typu 1, w przedziale wiekowym 21-67 lat, w tym 24 kobiety i 35 mężczyzn, ze średnim czasem trwania cukrzycy 21 lat;

85 pacjentów z cukrzycą typu 2, w przedziale wiekowym 33-77 lat, w tym 40 kobiet i 45 mężczyzn, ze średnim czasem trwania cukrzycy 6.8 lat.

Grupa osób zdrowych składała się ze 131 pracowników i studentów AM w przedziale wiekowym 20-76 lata, w tym 63 kobiety i 68 mężczyzn.

Z badania zostały wykluczone osoby z cukrzycą powikłaną niewydolnością nerek, proteinurią powyżej 30 mg albuminy/dobę, oraz wszystkie osoby z jawną makroangiopatią. Wszyscy pacjenci w przeciągu 14 dni przed pobraniem krwi nie przyjmowali leków zaburzających funkcję krwinek płytkowych takich jak: niesterydowe leki przeciwzapalne, inhibitory fosfodiesterazy, inhibitory kanału wapniowego oraz modyfikujące funkcję receptorów płytkowych.

Osoby biorące udział w badaniach były poinformowane o charakterze i celu badań i wyrażały ustną i pisemną zgodę na oddanie dodatkowych 10 ml krwi przy okazji wykonywania rutynowych badań kontrolnych zleconych przez lekarza prowadzącego. Badania zostały wykonane za zgodą Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy AM w Gdańsku-decyzje TKE BN/350/97 i TKE BN/252/2006.

### 4.2. Pobieranie krwi

Krew była pobierana z żyły łokciowej, od osób będących na czczo, o stałej porze dnia pomiędzy 8.00-9.00. Do badań parametrów morfologicznych i metabolizmu krwinek płytkowych, krew pobierano systemem próżniowym Vacuette firmy Greiner Bio-One (Austria) do probówek polietylenowych zawierających EDTA-K<sub>2</sub> o stężeniu końcowym 1.8mg/ml krwi. Do pozostałych badań biochemicznych krew była pobierana według zasad obowiązujących w laboratorium.



### 4.3. Odczynniki i materiały zużywalne

#### 4.3.1. Odczynniki

Koenzym A (CoA), acetylo-CoA, acetylo-fosforan, ATP, albumina wołowa, liaza cytrynianowa z *Bacillus subtilis*, glukoza-6-fosforan, cytrynian, dehydrogenaza jabłczanowa, fosfotransacetylaza, glukoza, HEPES, kwas tiobarbiturowy, NAD, NADH, NADP, NADPH,  $\alpha$ -ketoglutaran, pirofosforan tiaminy, ditiotreitól, pirogronian, syntaza cytrynianowa, szczawiooctan, TRIS, siarczan dodecyłu (SDS), glicyna, kwas barbiturowy, nadtlenuk wodoru, kwas kumarynowy, lucyferyna, lucyferaza, Tricina, fosfoenolpirogronian, kinaza pirogronianowa, rotenon, L-karnityna, trombina, 3-nitropropionian, 3-bromopirogronian, bursztynian, dichloroindofenól, azydek sodu, kwas 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowy (DNTB), bursztynian pochodzący z Sigma Chemicals Co., Poznań, Polska. Sephadex G-10 dostarczyła firma Pharmacia Upsala, Szwecja.

Tetrapeptyd (GPRP)-(H-Gly-Pro-Arg-Pro-NH<sub>2</sub>) hamujący agregację krwinek płytkowych otrzymano z Bachem AG, Budendorf, Szwajcaria.

Digitoninę dostarczono z Calbiochem, Los Angeles, USA. Bezwodnik kwasu maleinowego, szczawiooctan, merkaptoetanol, kwas trójchlorooctowy pochodzący z Fluka (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria).

Poliklonalne przeciwciała skierowane przeciw transporterowi glukozy typu 3 pochodzący z Chemicon (Chemicon International, Ochsenshausen, Niemcy), natomiast monoklonalne przeciwciała przeciwko beta aktynie (13E5), przeciwciała królicze drugorzędowe anti-IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową, anti-biotyna i biotynyłowana mieszanina białek wzorcowych pochodzący z Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Denver, USA).

Mieszanina żeli: akrylamidowego i metylenobisakrylamidowego (30% Acrylamide/Bis Solution) pochodziła z firmy Bio-Rad (Warszawa, Polska).

Lakton kwasu (-) hydroksycytrynowego z *Garcinia cambogia* otrzymano od dr L. Lewis, Mysore, Indie. Związek ten przeprowadzano w sól sodową przez dodanie ekwiwalentnej ilości NaOH (pH 7.4) i hydrolizę w 90°C przez 30 minut. SB-207049 otrzymano w darze od firmy SmithKline Beecham Pharmaceuticals.

#### 4.3.2. Materiały zużywalne

Kliska fotograficzna, odczynniki do wywołania i utrwalania były wyprodukowane przez firmę Kodak (Kodak Professional, Polymax, Rochester, USA). Błona nitrocelulozowa do elektrotransferu pochodziła z firmy Schleicher&Schuell (Dassel, Niemcy).

Rozpuszczalniki organiczne dostarczyły firma POCH (Gliwice, Polska) i Merck (Darmstadt, Niemcy).

#### 4.4. Ocena parametrów morfologicznych krwi

Badanie morfologii krwi obwodowej wraz z oceną liczby płytek (PLT) i ich średnią objętością (MPV) wykonywane było na analizatorze hematologicznym HMX (Beckman-Coulter, Miami, Florida, USA).

#### 4.5. Ocena stanu glikemii. Pomiar glukozy, hemoglobiny glikowanej, fruktozaminy

##### 4.5.1. Pomiar glukozy

Stężenie glukozy w osoczu krwi oceniano metodą heksokinazową, komercyjnym zestawem na analizatorze Architect 8000 (Abbott, Warszawa, Polska).

##### 4.5.2. Pomiar fruktozaminy

Stężenie fruktozaminy odzwierciedla średni stan glikemii w osoczu pacjenta w okresie 2 tygodni przed wykonaniem oznaczenia. Zasada pomiaru opiera się na redukcji błękitu tetrazolowego (NBT) w środowisku alkalicznym (pH 10.3).

Stężenie fruktozaminy osoczowej było oznaczane za pomocą zestawu firmowego (Nr kat. 1930010216) Roche (Zurich, Szwajcaria) na spektrofotometrze Ultrospec 3100 (Amersham-Pharmacia-Biotech, Cambridge, Wielka Brytania) przy długości fali 530 nm. Wyniki wyrażano w  $\mu\text{mol/l}$ .

##### 4.5.3. Pomiar hemoglobiny glikowanej

Hemoglobina glikowana odzwierciedla średni stan glikemii we krwi pacjenta w okresie około 3 miesięcy przed wykonaniem oznaczenia. Pomiarów dokonywano z użyciem techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej, za pomocą zestawu komercyjnego Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, GMBH, Monachium, Niemcy) na aparacie Variant II Hemoglobin Testing System (Bio-Rad Laboratories, GMBH, Monachium, Niemcy). Poziom hemoglobiny glikowanej wyrażano w procentach hemoglobiny całkowitej.

#### 4.6. Izolacja krwinek płytkowych

Krwinki płytkowe izolowano za pomocą metody wirowania różnicowego na wirówce MPW 223e (MPW-Instruments, Warszawa, Polska). Krew była pobierana do probówek z EDTA (1.8mg/ml), a następnie wirowana w temperaturze 4°C z prędkością 100x g przez 15 minut. Osocze bogatopłytkowe (PRP) przenoszono z nad warstwy osadzonych erytrocytów i leukocytów do probówek polietylenowych. Osad erytrocytów przemywano buforem o składzie 15mM HEPES, 5mM glukoza, 140mM NaCl erytrocytów w objętości potrzebnej do wyrównania objętości odebranego osocza i wirowano powtórnie w tych samych warunkach. Osocze bogatopłytkowe i nadsącz po przemyciu erytrocytów wirowano osobno w temperaturze 4°C z prędkością 500xg przez 10 minut. Po wirowaniu osocze zbierano do probówek typu Eppendorf i zamrażano w temperaturze -20°C do momentu wykonania oznaczenia poziomu fruktozaminy. Nadsącz po przemyciu odrzucano. Obydwa osady płytek łączono, przemywano jeden raz objętością buforu równą objętości wyjściowej krwi i wirowano w temperaturze 4°C z prędkością 500xg przez 10 minut. Liczbę krwinek płytkowych oraz stopień zanieczyszczenia uzyskanego preparatu innymi elementami morfotycznymi oznaczano za pomocą analizatora hematologicznego HMX (Beckman-Coulter, Miami, Florida, USA).

#### 4.7. Agregacja krwinek płytkowych (Born, 1962)

Zdolność krwinek płytkowych do agregacji oznaczono metodą turbidymetryczną, opartą na pomiarze zmian natężenia światła przechodzącego przez zawiesinę krwinek płytkowych. Agregację oznaczano w agregometrze dwukanałowym AFACT – Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer (Labor, Hamburg, Niemcy).

Zdolność krwinek płytkowych do agregacji była oceniana bez agonistów agregacji oraz po dodaniu trombiny o stężeniu końcowym 0.1 JM/ml. Agregację spontaniczną oraz indukowaną trombiną badano w objętości końcowej 0.3ml środowiska zawierającego 15mM HEPES-Na (pH 7.4), 5mM glukozę i 140mM NaCl i  $9 \times 10^8$  krwinek płytkowych. Pomiar agregacji był dokonywany w czasie 3 godzin od momentu pobrania krwi. Krwinki płytkowe inkubowano 2 minuty w kuwetach agregacyjnych w agregometrze AFACT w 37°C, przy stałym mieszaniu zawiesiny mieszadłem magnetycznym z prędkością 1000 obrotów/min. Po dodaniu trombiny rejestrowano zmiany natężenia światła przechodzącego przez kuwetę przez 10 minut. Agregacja spontaniczna była

mierzona 10 minut. Wynik agregacji wyrażano jako procent światła przechodzącego przez badaną próbkę.

#### 4.8. Reaktywne związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. Thiobarbituric Acid Reactive Species, TBARS) (Panse i wsp. 1985)

TBARS były oznaczane w zawiesinie krwinek płytkowych nieaktywowanych lub agregujących po dodaniu trombiny o stężeniu końcowym 0.1JM/ml w agregometrze w temperaturze 37°C, przez 10 minut. Do badanych próbek dodawano 0.3 ml 20% kwasu trójchlorooctowego, wytrząsano przez 30 minut w 4°C i wirowano przy 12000xg przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Do nadsącza dodawano 0.2 ml 2% kwasu tiobarbiturowego i inkubowano w temperaturze 100°C przez 15 minut. Absorbancję mierzono wobec próby kontrolnej odbiałczanej w czasie „0” na spektrofotometrze Shimadzu UV 1202 (Shimadzu Europa, Duisburg, Germany), przy długości fali 535 nm. Akumulacja TBARS była wyrażana jako nmole/10min/mg białka. Badania wykonywano w czasie 3 godzin od momentu pobrania krwi od pacjentów.

#### 4.9. Białko całkowite (Bradford, 1976)

Zawartość białka w płytkach oznaczano metodą wg Bradford (1976) przy użyciu immunoglobuliny ludzkiej w stężeniach od 0.1 do 0.4 mg/ml jako wzorca. Do 50 µl badanego wzorca lub próby dodawano 4.5ml roztworu błękitu brylantowego G-250. Absorbancja próbek była odczytywana po 10 minutach na spektrofotometrze Shimadzu, UV 1202 (Shimadzu Europa, Duisburg, Germany) przy długości fali 578 nm.

#### 4.10. Immunodetekcja białka transportera glukozy Glut3 (metodą Western-Blot)

Wyizolowane krwinki płytkowe były zawieszane w buforze zawierającym: 15mM HEPES, 5mM glukozę, 135mM NaCl i 0.1mM EDTA (stężenie białka 2mg/ml). Do zawiesiny dodawano równą objętość buforu lizującego o składzie: 50mM Tris HCl, 4% siarczan dodecyłu (SDS), 20% glicerol i 5% merkaptotanol, tak by końcowe stężenie białka było równe 1 mg/ml i zamrażano w - 20°C. Bezpośrednio przed rozdziałem elektroforetycznym próby inkubowano w 100°C przez 10 min. w łaźni wodnej. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przy użyciu aparatu Mini-Protean III (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) na 10% mini żelu poliakrylamidowym z 3% żelem zagęszczającym o grubości 1mm. Na ścieżki nanoszono próbki 35µg białka lizatów

płytkowych i 12µg mieszaniny biotynylowanych białek wzorcowych. Elektroforezę prowadzono w buforze 25 mM Tris, 192 mM glicyna i 0.1% SDS przez 135 min przy stałym napięciu 100V. Elektrotransfer białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową (0.45µm), prowadzono 135 min. w temp 4°C przy stałym napięciu 100V w buforze zawierającym: 25 mM Tris Base, 0.2 M glicynę i 20% metanol w aparacie Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Hercules, CA, USA). Następnie blokowano niespecyficzne miejsca wiążące białka przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej 10% roztworem albuminy w TBS-T (10% albumina, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl i 0.1% Tween-20, 0.02% azydek sodu, pH 7.4). Błonę płukano trzykrotnie przez 5 minut buforem TBS-T i inkubowano z poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi przeciw ludzkiemu Glut-3 (rozcieńczenie- 1:10000) w 2% roztworze albuminy w TBS-T przez noc, w temperaturze 4°C. Po inkubacji błonę płukano 4 razy przez 15 minut buforem TBS-T, dodawano przeciwciała drugorzędowe przeciw immunoglobulinom królika znakowane peroksydazą chrzanową (rozcieńczenie 1:5000) i przeciwciała przeciwbiotynie (rozcieńczenie-1:2000) w 2 % roztworze albuminy w TBS-T i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę. Błonę płukano 4 razy buforem TBS-T przez 15 minut. Następnie inkubowano przez 2 minuty w buforze do detekcji przygotowanym bezpośrednio przed użyciem i chronionym przed dostępem światła, o następującym składzie: 2.5 mM luminol, 0.002 mM kwas kumarynowy, 100 mM Tris Base o pH 8.5 i 0.02% woda utleniona. Luminescencję oznaczano poprzez ekspozycję błony fotograficznej na błonę, na którą dokonano transferu białek z żelu elektroforetycznego. Średni czas ekspozycji kliszy na działanie znakowanych białek wynosił 2 minuty.

Zawartość białka w prążkach zawierających Glut3 oznaczano w analizatorze do archiwizacji żeli Quantity One, Gel Doc, Bio-Rad, Warszawa, Polska.

W celu oznaczenia poziomu β-aktyny (białka referencyjnego) przeciwciała anty-Glut3 zaabsorbowane na błonie zrywano przez inkubację w roztworze TBS-T zawierającym 2% SDS i 5% merkaptoetanol przez 30 minut, w temperaturze 80°C. Po 4-krotnym przemyciu buforem TBS-T blokowano miejsca wiążące 10% albuminą w buforze TBS-T, błonę inkubowano z monoklonalnymi przeciwciałami przeciw β-aktynie (rozcieńczenie 1:10000) według schematu opisanego powyżej.

#### 4.11. Oznaczanie aktywności enzymów krwinek płytkowych

Aktywność enzymów krwinek płytkowych oznaczano w próbkach przechowywanych w 4°C, do 3 godzin od zakończenia preparatyki.

Krwinki płytkowe rozcieńczano do odpowiedniego stężenia białka roztworem Tritonu X-100 o końcowym stężeniu 0.2%. Pomiar aktywności enzymów wykonywano na spektrofotometrze Ultrospect 3000 pro (Amersham-Pharmacia-Biotech, Cambridge, Wielka Brytania) w temp. 37°C.

##### 4.11.1. Syntetaza kwasów tłuszczowych [EC 2.3.1.85] (Alberts i wsp. 1974)

Metoda oznaczania polega na rejestrowaniu spadku ekstynkcji NADPH w trakcie redukcji acetoacetylo-CoA powstającego z acetylo-CoA i malonylo-CoA. Środowisko w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 10 mM bufor K-fosforanowy (pH 7.4), 0.06 mM acetylo-CoA, 0.12 mM malonylo-CoA, 0.2 mM NADPH, 1.0 mM ditiotreitól, 1.0 mM EDTA i badaną próbkę zawierającą 0.2mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem malonylo-CoA i rejestrowano spadek absorbancji przy 340nm. Aktywność wyrażano w nmolach utlenionego NADPH/min/mg białka, na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADPH 6.22 /mol/cm.

##### 4.11.2. Syntetaza cytrynianowa (CS) [EC 2.3.3.1] (Wright i wsp. 1967)

Syntaza cytrynianowa katalizuje kondensację szczawiooctanu z acetylo-CoA z wytworzeniem cytrynianu. Powstający CoA-SH redukuje DNTB (amid kwasu 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoesowego) do NTB (amidu 2-nitro-5-merkaptobenzoesowego). Środowisko w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 100 mM bufor Tris-HCl, pH 8.0, 0.06 mM acetylo-CoA, 0.2 mM szczawiooctan, 0.2 mM DNTB oraz badaną próbkę 0.1 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem szczawiooctanu i rejestrowano przyrost ekstynkcji przy  $\lambda=405$  nm. Aktywność obliczano na podstawie absorbancji molowej dla NTB 19.15/mol/cm. Próbę zerową stanowiły krwinki płytkowe w środowisku bez acetylo-CoA.

##### 4.11.3. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) [EC 1.2.4.1] (Szutowicz i wsp. 1981)

Aktywność PDH oznaczano przez pomiar powstającego acetylo-CoA poprzez sprzężenie reakcji z syntazą cytrynianową. Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 0.2 ml zawierało: 50 mM bufor Tris/HCl, pH 8.3, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM

ditiotreitol, 2.0 mM NAD, 10 mM pirogronian, 2.0 mM pirofosforan tiaminy, 0.2 mM CoA, 2.5 mM szczawiooctan, 0.5 J.M. syntazy cytrynianowej. Reakcję rozpoczynano dodaniem próbki zawierającej 0.05 mg białka. Inkubacja prowadzona była przez 30 minut w 37 °C, w łaźni wodnej przy stałym mieszaniu z prędkością 100 cykli/min. Reakcję przerywano przez inkubację w 100°C przez 10 minut, w celu denaturacji białka i usunięcia nadmiaru szczawiooctanu. W uzyskanych próbach oznaczano zawartość cytrynianu. Środowisko reakcyjne do oznaczania cytrynianu zawierało w końcowej objętości 0.7 ml: 100 mM Tris/HCl; pH 7.4; 0.1 mM NADH, 1 JM dehydrogenazy jabłczanowej i 50µl odbiałczonej próby. Reakcję rozpoczynano dodaniem 0.1 JM liazy cytrynianowej-bakteryjnej [EC 3.1.2.16] i rejestrowano spadek absorbancji przy  $\lambda=340$  nm. Próby zerowe stanowiły krwinki płytkowe inkubowane w środowisku bez CoA. Aktywność wyrażano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

#### 4.11.4. Kompleks dehydrogenazy $\alpha$ -ketoglutaranowej (KGDH) [EC 1.2.4.4] (Pawełczyk i Angielski, 1984)

Aktywność KGDH oznaczano przez pomiar wzrostu absorbancji spowodowanej redukcją NAD do NADH w reakcji dekarboksylacji oksydacyjnej  $\alpha$ -ketoglutaranu do bursztynylo-CoA.

Środowisko w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 75 mM HEPES Na (pH 7.6), 1.0 mM NAD, 0.5 mM pirofosforan tiaminy, 1.0 mM DTT, 50 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM 2-oksoglutaran oraz badaną próbkę 0.2 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem CoA o końcowym stężeniu 0.15 mM i rejestrowano wzrost absorbancji przy  $\lambda=340$  nm. Aktywność obliczano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADH 6.22/mol/cm.

#### 4.11.5. Akonitaza [EC 4.2.1.3] (De Villafranca i Haines, 1974)

Aktywność akonitazy oznaczano przez pomiar wzrostu absorbancji spowodowanej redukcją NADP do NADPH w reakcji utleniania izocytrynianu powstającego z akonitanu.

Środowisko w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 100 mM Tris/HCl (pH 7.6), 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM NADP, 1 JM dehydrogenazy izocytrynianowej NADP zależnej [EC 1.1.1.42] oraz badaną próbkę 0.2 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem cis-akonitanu o stężeniu końcowym 0.3 mM i rejestrowano wzrost absorbancji przy  $\lambda=340$

nm. Aktywność obliczano w nmolach utlenionego NADPH/min/mg białka na podstawie współczynnika absorbancji molowej dla NADPH 6.22/mol/cm.

4.11.6. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa [EC 1.1.1.49] (Glock i Mc. Lean, 1953)  
Oznaczanie dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej opiera się na pomiarze absorbancji spowodowanej redukcją NADP do NADPH w trakcie utleniania glukozy-6-fosforanu do 6-fosfoglukonianu. Środowisko w objętości końcowej 0.7 ml zawierało: 100 mM bufor Tris-HCl (pH 7.4), 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM NADP, 1.0 mM glukozy-6-fosforan i próbkę 0.1 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem glukozy-6-fosforanu i rejestrowano przyrost absorbancji przy  $\lambda=340$  nm. Aktywność specyficzną obliczano na podstawie molowego współczynnika absorbancji 6.22/ mol/cm.

4.11.7. Dehydrogenaza mleczanowa [EC 1.1.1.27] (Kornberg, 1955)  
Środowisko w objętości końcowej 0.7 ml zawierało: 100 mM bufor K-fosforanowy, (pH 7.4), 1.0 mM pirogronian, 0.1 mM NADH i próbkę 0.05 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem pirogronianu i rejestrowano spadek absorbancji związany z utlenianiem NADH przy  $\lambda=340$  nm. Aktywność specyficzną obliczano na podstawie molowego współczynnika absorbancji 6.22/mol/cm.

4.11.8. Dehydrogenaza glutaminianowa [EC 1.4.1.4] (Fahien i Cohen, 1970)  
Środowisko w końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 50 mM bufor K-fosforanowy, (pH 7.4), 2.5 mM  $\alpha$ -ketoglutaran, 0.2 mM NADH, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA, próbkę badaną 0.05 mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem  $\alpha$ -ketoglutaranu i rejestrowano spadek absorbancji przy  $\lambda=340$  nm proporcjonalny do ilości utlenionego NADH. Aktywność specyficzną obliczano na podstawie molowego współczynnika absorbancji 6.21/mol/cm.

4.11.9. Dehydrogenaza bursztynianowa (SDH) [EC 1.3.99.1] (Veeger i wsp. 1969)  
Aktywność SDH oznaczano przez pomiar szybkości spadku absorbancji przy  $\lambda=600$  nm przy redukcji utlenianego dichloroindofenolu. Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 0.7ml zawierała: 50 mM bufor fosforanowy (pH 7.6), 0.072 mM dichloroindofenol, 100 mM EDTA i 4.0 mM azydek sodu. Reakcję rozpoczynano dodaniem 40 mM bursztynianu. Aktywność specyficzną obliczano na podstawie molowego współczynnika absorbancji dla utlenionego dichloroindofenolu 19.5/mol/cm.



#### 4.11.10. Liaza ATP-cytrynianowa [EC 2.3.3.8] (Szutowicz i Angielski, 1970)

Aktywność liazy ATP-cytrynianowej mierzono przez oznaczenie powstającego szczawiooctanu w reakcji wskaźnikowej katalizowanej przez dehydrogenazę jabłczanową [EC 1.1.1.38] z użyciem NADH.

Środowisko inkubacyjne o końcowej objętości 0.7 ml zawierało: 50 mM bufor Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM cytrynian, 0.2 mM CoA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditiotreitol, 100 mM KCl, 2 JM dehydrogenazy jabłczanowej, 0.2 mM NADH i badaną próbkę 0.2mg białka. Reakcję rozpoczynano dodaniem 5mM ATP i mierzono spadek absorbancji w temperaturze 37°C, przy długości fali  $\lambda=340\text{nm}$ . Aktywność wyrażano w nmolach utlenionego NADH/min/mg białka.

#### 4.12. Badanie parametrów metabolizmu krwinek płytkowych

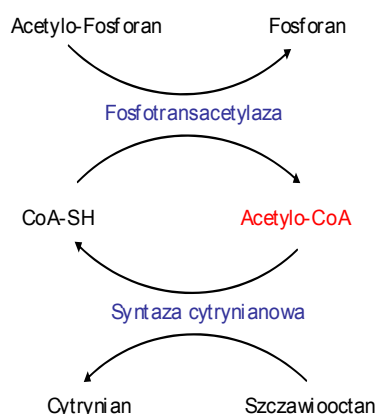
Zawartość acetylo-CoA, ATP/ADP i glukozy-6-fosforanu była oznaczana w świeżo wyizolowanych krwinkach płytkowych inkubowanych w środowisku zawierającym 2.5mM glukozę, w celu zachowania stabilnych warunków metabolizmu energetycznego krwinek płytkowych. Środowisko inkubacyjne w końcowej objętości 1.5ml zawierało: 20 mM NaHEPES (pH 7.4), 1.7 mM bufor Na-fosforanowy, (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5.5 mM KCl i 2.5 mM glukozę. W doświadczeniach, w których oceniano zawartość acetylo-CoA i ATP/ADP w płytkach aktywowanych, do środowiska dodawano 0.1JM/ml trombiny łącznie z 2.5 mM tetrapeptydem (GPRP) hamującym agregację płytek (Michelson 1994). Ewentualne zmiany składu środowiska zaznaczono w tekście. Inkubację rozpoczynano dodaniem zawiesiny płytek (0.75-1.0mg białka) i prowadzono w polistyrenowych płaskodennych naczynkach inkubacyjnych, przez 30 minut w łaźni wodnej w 37°C, ze stałym mieszaniem 100 cykli na minutę. Po tym czasie mieszaninę inkubacyjną umieszczano w lodzie i dzielono na trzy części o objętościach: 0.6 ml, 0.5 ml i 0.25 ml, które używano odpowiednio do oznaczenia całkowitego acetylo-CoA, mitochondrialnego acetylo-CoA i ATP/ADP.

##### 4.12.1. Oznaczanie całkowitego acetylo-CoA (Szutowicz i Bielarczyk, 1987)

Po odwirowaniu 0.6 ml mieszaniny inkubacyjnej przy 12 000xg przez 1 minutę, pelętę krwinek płytkowych odbiałczano przez dodanie 0.1 ml 5 mM HCl i inkubację przez 1 minutę w 100°C. Zawiesinę zamrażano w temperaturze -20°C. W dniu oznaczania

acetylo-CoA próby rozmrażano, wirowano a nadsącz zobojętniano 50mM roztworem Tris. Acetylo-CoA oznaczano metodą cyklizacyjną z syntazą cytrynianową i fosfotransacetylazą (patrz schemat). Metoda ta umożliwia kilkutyśięczny obrót substancji badanej w cyklu pomiarowym i pomiar kilkunastonastomolowych ilości cytrynianu w próbce jako produktu końcowego. Wolny CoA-SH usuwano z badanych próbek przed poddaniem ich cyklizacji przez niedwzracalne związanie z bezwodnikiem kwasu maleinowego. Do 0.04 ml próbki dodawano 0.01ml 0.5 M buforu Tris/HCl (pH 7.4) i 0.01 ml świeżo sporządzonego 1.0 mM roztworu bezwodnika maleinowego w eterze etylowym. Próby wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 10 minut w wytrząsarce Eppendorf typ 3300, a następnie inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej.

Równolegle z próbami wykonywano krzywą standardową zawierającą 0-10 pmoli acetylo-CoA i 60 pmoli CoA-SH. Środowisko cyklizacyjne zawierało: 50 mM bufor Tris/HCl (pH 7.4), 5.0 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0.01% (w/v) albuminę wołową; 1.2 mM szczawiooctan, 1.0 mM acetylofosforan, 0.72 JM fosfotransacetylazy (oczyszczonej na Sephadexie G-10) i 1 JM syntazy cytrynianowej. Reakcję cyklizacji rozpoczynano przez dodanie 0.05 ml środowiska cyklizacyjnego, prowadzono w 30°C przez 100 minut. Reakcję przerywano umieszczając próbkę na 10 minut w bloku grzewczym w 100°C. Zakumulowany cytrynian oznaczano jak w p. 4.11.3.



Zasada oznaczania acetylo-CoA metodą cyklizacyjną

#### 4.12.2. Oznaczanie mitochondrialnego acetylo-CoA (Szutowicz i Bielarczyk, 1987)

Do oceny wewnątrzkomórkowej dystrybucji acetylo-CoA 0.5 ml zawiesiny płytek w środowisku inkubacyjnym mieszano z 0.5 ml środowiska zawierającego: 20mM Tris-HCl (7.4), 125 mM KCl, 3.0 mM EDTA i 1.4mg/ml digitoniny. Następnie 0.7 ml mieszaniny nanoszono na 500 ml mieszaniny olejów silikonowych (AR-20 i AR-200 1:2). Po 30 sekundach, mieszaninę wirowano przez 1 minutę przy 14000xg w celu uzyskania rozdziału na warstwę cytosolową i mitochondrialną. Górna warstwa cytosolowa była zbierana do oznaczenia białka, zaś warstwa dolna-olejowa odrzucana. Osad mitochondriów płytkowych na dnie próbówki był odbiałczany przez dodanie 0.1 ml 5 mM HCl i inkubację w 100°C przez 1 minutę, uzyskiwany nasącz był używany do oznaczenia mitochondrialnego acetylo-CoA.

Zawartość cytoplazmatycznego acetylo-CoA obliczano jako różnicę między jego poziomem w całych płytkach i mitochondriach płytek.

#### 4.12.3. Oznaczanie ATP i ADP (Gorman i wsp. 2003)

##### 4.12.3.1. Oznaczanie ATP

ATP oznaczano w obecności lucyferazy i jej substratu lucyferyny. Lucyferaza katalizuje reakcję adenylacji lucyferyny przez ATP. Podczas spontanicznego utleniania adenylolucyferyny powstaje kwant światła, który jest mierzony luminometrycznie. Pomiarów emisji światła dokonywano na luminometrze Junior (Berthold Technology, Bad Wild-bad, Niemcy).

Krwinki płytkowe inkubowano w środowisku opisanym w punkcie 4.12.1. Zawiesinę krwinek płytkowych w środowisku inkubacyjnym wirowano przez 1 minutę przy 12000xg. Uzyskany nadsącz inkubowano przez 3 minuty w 100°C i używano do oznaczenia ilości wydzielonego ATP i ADP. Osad krwinek płytkowych zawieszano w 0.1 ml podwójnie destylowanej wody, odbiałczano przez inkubację przez 3 minuty w 100°C i używano do pomiarów wewnątrzpłytkowej puli ATP i ADP. Środowisko do oznaczania ATP i ADP w objętości końcowej 0.2 ml zawierało: 25 mM Tricine HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM ditiotreitól, 0.5 mM lucyferynę i 6 JM lucyferazy [EC 1.13.12.7]. Pomiar rozpoczynano dodaniem 0.02ml próby badanej. Po 10 sekundach odczytywano emisję maksymalną próby i dodawano 0.02ml 10-20 pmoli

wzorca wewnętrznego ATP. Zawartość ATP w próbie badanej obliczano przez porównanie luminescencji próby z luminescencją wzorca ATP.

#### 4.12.3.2 Oznaczanie ADP

Zawartość ADP w osadzie krwinek płytkowych i w nadsączu wyliczano jako różnicę sumy ATP i ADP oznaczoną w środowisku zawierającym dodatkowo 43  $\mu$ M fosfoenolopirogronian oraz 50 JM kinazy pirogronianowej [EC 2.7.1.40], a poziomem ATP oznaczonym w równoległym pomiarze wg punktu 4.12.3.1. Zawartość ATP/ADP w próbie obliczano przez porównanie z luminescencją wzorca wewnętrznego ATP. Wynik wyrażano jako nmole/mg białka.

#### 4.12.4. Oznaczanie poziomu glukozy-6-fosforanu

Glukozy-6-fosforan jest utleniany do 6-fosfoglukonianu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową. Dokonywany jest pomiar fluorescencji NADPH powstającego w czasie redukcji NADP przy fali wzbudzenia  $\lambda = 340$  nm i emitowanej  $\lambda = 456$  nm. Krwinki płytkowe inkubowano w środowisku opisanym w 4.12.1. Reakcję przerywano umieszczając próby w lodzie, po odwirowaniu przy 12000xg przez 1 minutę. Peletę krwinek płytkowych odbiałczano 0.2 ml 3% kwasu nadchlorowego. Próby zobojętniano roztworem  $K_2CO_3$ . Pomiar przeprowadzano w kuwecie kwarcowej, na fluorymetrze Perkin Elmer LS 55 (Norwalk, USA). Środowisko do oznaczania glukozy-6-fosforanu w objętości 0.4 ml zawierało: 100 mM Tris/HCl (pH 7.6), 4.0 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM NADP i odbiałczoną próbkę. Reakcję rozpoczynano dodaniem 1 JM dehydrogenazy-glukozy-6-fosforanowej. Zawartość glukozy-6-fosforanu obliczano z krzywej kalibracyjnej o zakresie 100-1000 pmoli tego metabolitu.

#### 4.13. Metody statystyczne

Wyniki zostały przedstawione jako średnie arytmetyczne + standardowy błąd średniej. Statystyczną istotność różnic między grupami weryfikowano niesparowanym testem t-Studenta, a wewnątrz grup testem sparowanym. Za najmniejszy znamieny poziom istotności różnicy uznano  $p < 0.05$ . Dystrybucja wyników była oceniana testem Kolmogorowa-Smirnova; wartość  $p > 0.1$  uznawano za wskaźnik normalnej dystrybucji. Współzależność pomiędzy analizowanymi parametrami oceniano przy pomocy współczynnika korelacji liniowej z użyciem testu Pearsona. Obliczenia statystyczne były wykonane za pomocą programów Graph Pad Prism 4 Graph (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) i Microsoft Excel 5.0.

## 5. WYNIKI

### 5.1. Charakterystyka grup doświadczalnych

Patomechanizmy cukrzycy typu 1 i 2 są różne. W typie 1 przyczyną jest niedobór insuliny. Natomiast w typie 2, bardziej heterogennym, częstą przyczyną jest insulinooporność lub/i zmniejszenie wrażliwości komórek B wysepek trzustki na hiperglikemię. Dlatego we wstępnej fazie analizy wyników pacjenci z cukrzycą byli traktowani jako oddzielne grupy.

#### 5.1.1. Charakterystyka pacjentów

Średni wiek osób z cukrzycą typu 1 wynosił 38.8 lat, a osób z cukrzycą typu 2- 55.4 lat. Dlatego dla każdej z tych grup dobrano odpowiadającą wiekowo grupę referencyjną osób zdrowych odpowiednio w średnim wieku 39.6 (grupa 1) i 54.7 (grupa 2) (Tabela 1). Średni czas trwania cukrzycy w grupie osób z cukrzycą typu 1 wynosił 21.1 lat, a w cukrzycy typu 2- 6.8 lat (Tabela 1).

#### 5.1.2. Wpływ cukrzycy na parametry stanu glikemii i gospodarkę lipidową

Stężenia glukozy w osoczu oraz poziomy parametrów retrospektywnej oceny glikemii w tym hemoglobiny glikowanej we krwi i fruktozaminy w osoczu były u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 wyższe odpowiednio o około 80%, 60% i 50% w porównaniu z odpowiednimi grupami osób zdrowych (Tabela 1). Równocześnie nie wykazano różnic w wartościach glikemii i parametrach kontroli glikemii zarówno pomiędzy grupą 1 i 2 osób zdrowych oraz pomiędzy pacjentami z cukrzycą typu 1 i 2 (Tabela 1, Ryc. 2). Poziom hemoglobiny glikowanej poniżej poziomu 6.5%, uznawanego za wartość zadowalającej kontroli glikemii (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, 2006), stwierdzono u 8 z 59 pacjentów z cukrzycą typu 1 i u 7 z 85 pacjentów z cukrzycą typu 2 (Ryc. 2A).

Stężenie fruktozaminy w osoczu niższe od 285  $\mu\text{mol/L}$  stanowiące poziom odcięcia dla osób zdrowych obserwowano u 14% osób z cukrzycą typu 1 i u 8% pacjentów z cukrzycą typu 2 (Ryc. 2B). Łącznie u 3 osób zdrowych stężenie fruktozaminy było nieznacznie wyższe od wartości granicznej dla tej grupy (Ryc. 2B).

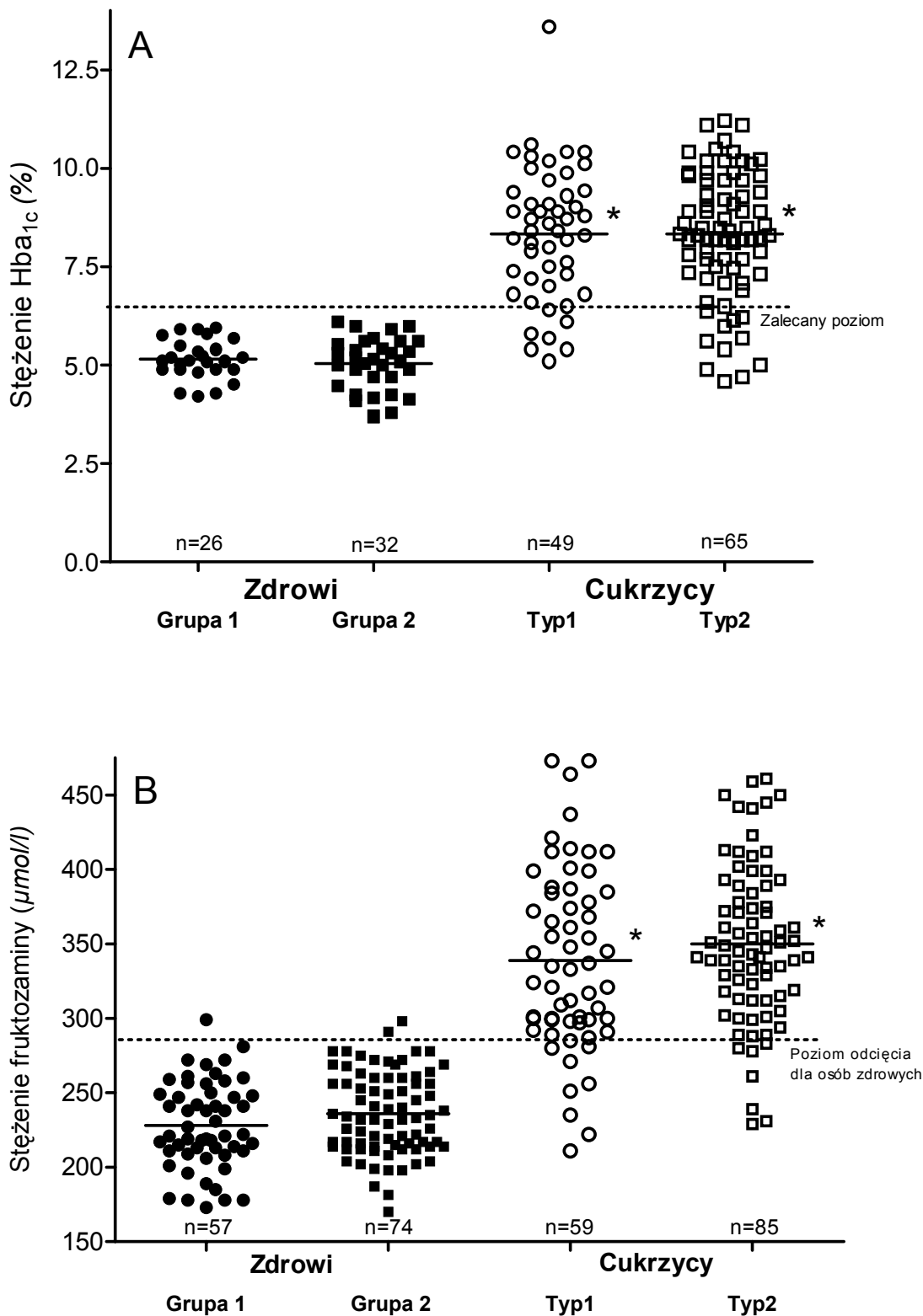
Stężenia cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL w surowicy w grupie 2 (starszej) osób zdrowych i osób z cukrzycą typu 2 były znamienne wyższe w

porównaniu odpowiednio z grupą 1 (młodsza) osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 1 (Tabela 1).

Tabela 1. Dane demograficzne i parametry laboratoryjne gospodarki węglowodanowej i lipidowej osób zdrowych i chorych na cukrzycę.

Parametr	Zdrowi		Cukrzycy	
	Grupa 1	Grupa 2	Typ 1	Typ 2
Ilość badanych (kobiety/mężczyźni)	30/27	33/41	24/35	40/45
Wiek (lat)	39.6±1.5 (20-64)	54.7± 1.1 (31-76)	38.8±1.5 (21-67)	55.4± 1.0 (33-77)
Czas trwania cukrzycy (lat)	nie dotyczy	nie dotyczy	21.1±1.4 (0.2-38)	6.80±0.68 (0.5-23)
Glukoza (mg/dl)	92.4±0.9 (78-101)	91.1±0.88 (67-100)	168±8* (91-299)	166±4* (86-278)
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.24±0.15 (4.21-5.94)	5.12±0.10 (3.7-6.1)	8.34±0.29* (5.1-13.6)	8.41±0.18* (4.6-11.2)
Fruktozamina (μmol/l)	228±4 (173-299)	236±3 (170-298)	339±8* (211-473)	354±7* (229-461)
Cholesterol (mg/dl)	160±5 (98-243)	205±5 <sup>‡</sup> (139-329)	175±4 (125-253)	211±4 <sup>†</sup> (137-321)
Cholesterol LDL (mg/dl)	95.8±4.6 (38-178)	124±4 <sup>‡</sup> (54-233)	107±3 (66-184)	121±5 <sup>†</sup> (79-181)
Cholesterol HDL (mg/dl)	52.4±1.9 (40-75)	57.0±1.0 (42-76)	50.9±1.4 (35-71)	54.7±0.9 (41-75)
Triglicerydy (mg/dl)	109±3 (85-154)	119±4 (60-212)	123±4** (69-205)	162±8** <sup>†</sup> (52-321)

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z liczby badań podanej w tabeli. W nawiasach podano zakresy uzyskanych wartości parametrów pomiarowych. Poziomy glukozy i lipidów oznaczono u ponad 30% osób zdrowych i ponad 40% osób z cukrzycą, a hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) u 58 osób zdrowych oraz 49 pacjentów z cukrzycą typu 1 i 65 z cukrzycą typu 2. Poziomy fruktozaminy zbadano u 100% przypadków. W nawiasach podano zakresy uzyskanych wartości parametrów pomiarowych. Znamienne różne od: osób zdrowych w tym samym przedziale wiekowym \*p<0.0001, \*\*p<0.05, od osób z cukrzycą typu 1 <sup>†</sup>p<0.01; od grupy 1 osób zdrowych <sup>‡</sup>p<0.01.



Rycina. 2. Dystrybucja wartości Hb<sub>a1c</sub> we krwi (A) i fruktozaminy w osoczu (B) w badanych grupach (n=liczba przypadków).

Znamiennie różne od: odpowiedniej grupy osób zdrowych \*p<0.0001.

Nie wykazano różnic w stężeniach cholesterolu całkowitego i frakcji LDL pomiędzy odpowiadającymi wiekowo grupami osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą (Tabela 1). Stężenie triglicerydów w 1 i 2 grupie cukrzyków było wyższe o 13% i 36% w porównaniu z odpowiednimi grupami osób zdrowych (Tabela 1). Jednocześnie poziom triglicerydów u osób z cukrzycą typu 2 był o 32% wyższy niż w cukrzycy typu 1. Nie wykazano różnic w poziomach cholesterolu frakcji HDL pomiędzy badanymi grupami (Tabela 1).

### 5.1.3. Parametry morfologiczne krwi

Nie wykazano różnic w liczbie leukocytów, erytrocytów, wartościach hematokrytu i stężeniu hemoglobiny pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi (Tabela 2). Również liczba krwinek płytkowych, ich średnia objętość i płytkokryt w poszczególnych grupach eksperymentalnych były podobne (Tabela 2).

Tabela 2. Parametry morfologiczne krwi obwodowej osób zdrowych i chorych na cukrzycę.

Parametr	Zdrowi		Cukrzycy	
	Grupa 1	Grupa 2	Typ 1	Typ 2
WBC ( $\times 10^3/\mu l$ )	7.02±0.20 (4.21-10.0)	6.35±0.16 (4.10-9.60)	7.80±0.19 (4.90-10.3)	7.22±0.16 (4.50-10.2)
RBC ( $\times 10^6/\mu l$ )	4.74±0.05 (4.10-5.70)	4.69±0.05 (3.80-5.98)	4.67±0.19 (3.30-5.42)	4.77±0.16 (3.80-5.90)
Hb (g/dl)	14.3±0.1 (12.4-16.7)	14.5±0.2 (12.0-18.0)	14.4±0.1 (12.0-18.0)	14.6±0.2 (11.5-18.0)
PLT ( $\times 10^3/\mu l$ )	249±6 (161-388)	250±6 (148-385)	238±6 (150-312)	259±6 (150-418)
MPV (fl)	8.65±0.13 (5.80-11.0)	8.94±0.13 (6.50-12.0)	8.71±0.14 (5.40-10.8)	8.95±0.10 (5.70-11.1)
PCT (%)	0.21±0.05 (0.16-0.25)	0.24±0.07 (0.16-0.38)	0.22±0.01 (0.15-0.36)	0.22±0.01 (0.15-0.31)

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z liczby badań podanych w Tabeli 1. W nawiasach podano zakresy uzyskanych parametrów pomiarowych.



#### 5.1.4. Parametry izolowanych krwinek płytkowych

Zastosowana procedura izolacji krwinek płytkowych umożliwiała odzyskanie średnio 62% krwinek płytkowych (porównaj: Tabela 2, rząd 4 i Tabela 3, rząd 3). Średnia objętość izolowanych krwinek płytkowych była o 2%-5% mniejsza (Tabela 3, rząd 4) niż płytek krwi w pełnej krwi (Tabela 2, rząd 5). Zanieczyszczenie preparatu krwinek płytkowych przez leukocyty było mniejsze niż 0.1%, a przez erytrocyty wahało się od 1.4% do 3.2% (Tabela 3).

Powyższe dane wskazują, że zastosowana metoda izolacji umożliwiła uzyskanie krwinek płytkowych minimalnie zanieczyszczonych innymi elementami morfotycznymi krwi oraz, że nie powodowała ona istotnej zmiany objętości krwinek płytkowych.

Tabela 3. Parametry preparatu krwinek płytkowych otrzymanego metodą wirowań różnicowych.

Parametr	Osoby zdrowe		Pacjenci z cukrzycą	
	Grupa 1	Grupa2	Typ 1	Typ 2
WBC ( $\times 10^3/\mu l$ )	0.1±0.01 (0.0-0.2)	0.1±0.01 (0.0-0.2)	0.1±0.01 (0.0-0.2)	0.1±0.01 (0.0-0.2)
RBC ( $\times 10^3/\mu l$ )	4.0±0.1 (0-4.0)	5.0±0.1 (0-5.0)	4.0±0.1 (0-4.2)	2.0±0.1 (0-2.0)
PLT ( $\times 10^3/\mu l$ )	134±4 (99-205)	146±5 (98-226)	145±5 (99-219)	145±5 (89-230)
MPV (fl)	8.44±0.12 (7.40-11.0)	8.75±0.12 (7.20-11.0)	8.31±0.08 (7.20-9.30)	8.47±0.11 (6.80-10.7)
Odzysk (%)	59.2%±1.4	66.1%±1.1	62.2%±0.8	61.6%±1.1

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 57-85 badań. W nawiasach podano zakresy analizowanych wartości pomiarowych.

### 5.1.5. Rozdział frakcji mitochondrialnej i cytosolowej krwinek płytkowych

Po rozpuszczeniu błon plazmatycznych krwinek płytkowych digitoniną i wirowaniu przez olej silikonowy (AR 20:F 200=2:1) 76% białka odzyskiwano we frakcji cytosolowej, a 24% we frakcji mitochondrialnej (Tabela 4) Około 85 % aktywności dehydrogenazy mleczanowej było obecne we frakcji cytosolowej, a 15% było związane z frakcją mitochondrialną. We frakcji mitochondrialnej wykazano obecność 87% całkowitej aktywności dehydrogenazy glutaminianowej, a pozostałe 13% obecne było we frakcji cytosolowej.

Tabela 4. Frakcjonowanie krwinek płytkowych digitoniną.

	Całe płytki	Frakcja mitochondrialna	Frakcja cytosolowa
Dehydrogenaza mleczanowa (nmole/min/mg białka)	1991±50.1	292±14.1	1699±56.7
Dehydrogenaza glutaminianowa (nmole/min/mg białka)	14.8±1.1	12.9±0.8	1.9±0.11
Białko %	100	24	76

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 3 doświadczeń wykonanych podwójnie.

## 5.2. Parametry metaboliczne krwinek płytkowych

### 5.2.1. Wpływ cukrzycy na zawartość i dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

Zawartość całkowitego acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób z 1 i 2 typem cukrzycy inkubowanych w obecności 2.5 mM glukozy była wyższa odpowiednio o 68% i 54% w porównaniu z płytkami grup 1 i 2 osób zdrowych (Tabela 5, Ryc. 3). W nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą typu 1 zawartość mitochondrialnego acetylo-CoA była o 83%, a z cukrzycą typu 2 o 55% wyższa w porównaniu z mitochondriami krwinek płytkowych odpowiednich grup osób

zdrowych (Tabela 5). Poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA w krwinkach płytkowych w obu typach cukrzycy był wyższy o około 50% w porównaniu z cytoplazmą krwinek płytkowych osób zdrowych (Tabela 5).

Tabela 5. Zawartość i dystrybucja acetylo-CoA w nieaktywowanych i aktywowanych krwinkach płytkowych.

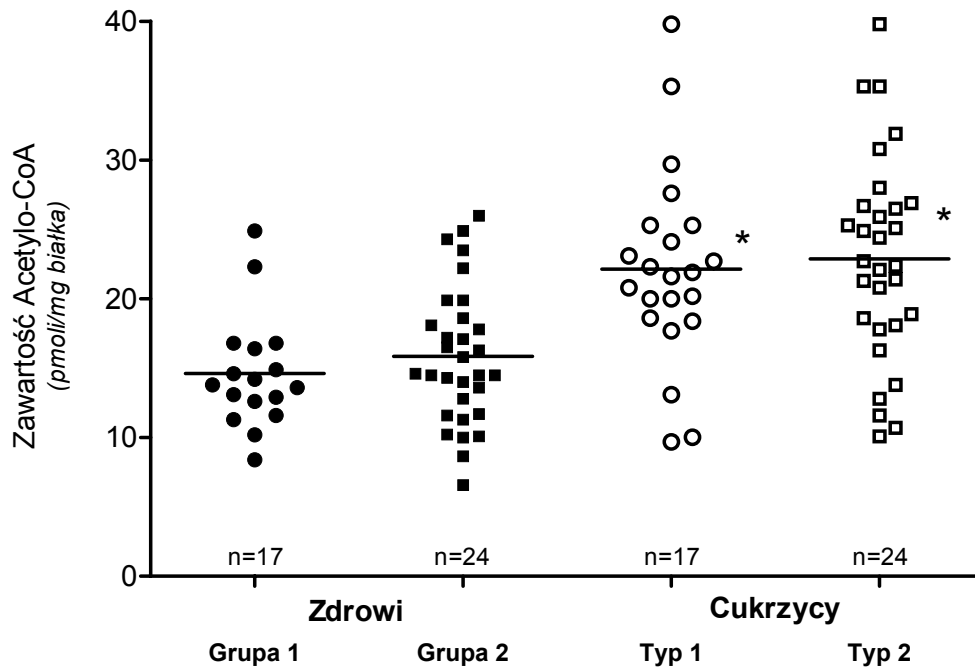
Warunki Parametr	Zdrowi		Cukrzycy	
	Grupa 1	Grupa 2	Typ 1	Typ 2
<i>Bez aktywacji</i>	n=13	n=19	n=18	n=23
Całkowity Acetylo-CoA ( <i>pmole/mg białka</i> )	12.8±0.4 (5.4-16.8)	14.3±0.5 (6.6-24.9)	21.5±1.0* (9.7-39.8)	22.0±0.9* (10.1-39.8)
Mitochondrialny Acetylo-CoA ( <i>pmole/mg białka</i> )	8.1±0.3 (3.9-12.1)	9.1±0.4 (3.5-16.2)	14.8±0.6* (7.0-24.5)	14.1±0.6* (6.10-24.1)
Cytoplazmatyczny Acetylo-CoA ( <i>pmole/mg białka</i> )	4.7±0.4 (0.7-10.2)	5.2±0.2 (1.9-8.7)	6.8±0.5** (2.7-15.3)	8.0±0.4** (1.9-16.7)
<i>Aktywacja trombiną</i>	n=5	n=7	n=8	n=12
Całkowity Acetylo-CoA ( <i>pmole/mg białka</i> )	10.2±0.2 <sup>†</sup> (9.7-0.2)	11.3±0.3 <sup>†</sup> (7.4-13.6)	12.9±0.2 <sup>†*</sup> (9.8-15.5)	12.0±0.4 <sup>†</sup> (6.4-16.6)
Mitochondrialny Acetylo-CoA ( <i>pmole/mg białka</i> )	6.1±0.2 <sup>†</sup> (4.6-6.9)	7.3±0.3 <sup>††</sup> (2.7-10.1)	8.0±0.2 <sup>†*</sup> (5.4-10.8)	7.3±0.2 <sup>†</sup> (2.7-10.3)
Cytoplazmatyczny Acetylo-CoA ( <i>pmole/mg białka</i> )	4.4±0.1 (3.3-6.3)	3.9±0.3 <sup>†</sup> (2.7-10.1)	4.9±0.2 (2.5-7.1)	4.8±0.2 <sup>†**</sup> (3.0-7.2)

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z liczby badań wykonanych podwójnie podanych w tabeli. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49). W nawiasach podano zakresy uzyskanych wartości. Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.0001, \*\*p<0.05; do warunków bez aktywacji <sup>†</sup>p<0.005, <sup>††</sup>p<0.02.

Nie wykazano różnic w zawartości całkowitego, mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA pomiędzy krwinkami płytkowymi grupy 1 i 2 osób zdrowych oraz między płytkami pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 (Tabela 5, Ryc. 3).

Aktywacja trombiną krwinek płytkowych osób zdrowych grupy 1 i 2 powodowała spadek zawartości całkowitego acetylo-CoA odpowiednio o 20% i 21%, a w cukrzycy typu 1 i 2 odpowiednio o 40% i 45% (Tabela 5). Spadek zawartości mitochondrialnego acetylo-CoA był również dwukrotnie wyższy w aktywowanych płytkach obu grup osób z cukrzycą w porównaniu z mitochondriami płytek odpowiednich grup osób zdrowych (Tabela 5). W cytoplazmie krwinek płytkowych osób z cukrzycą typu 1 i 2 aktywacja trombiną powodowała również 2-3 krotnie wyższy spadek poziomu acetylo-CoA w porównaniu z przedziałem cytoplazmatycznym aktywowanych krwinek płytkowych osób zdrowych (Tabela 5). W efekcie poziomy acetylo-CoA w aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą typu 1 były tylko o 26% wyższe niż w aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych grupy 1 (Tabela 5). Poziomy acetylo-CoA w cytoplazmie aktywowanych krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą typu 2 nie różniły się od poziomu tego metabolitu w płytkach osób zdrowych grupy 2 (Tabela 5).

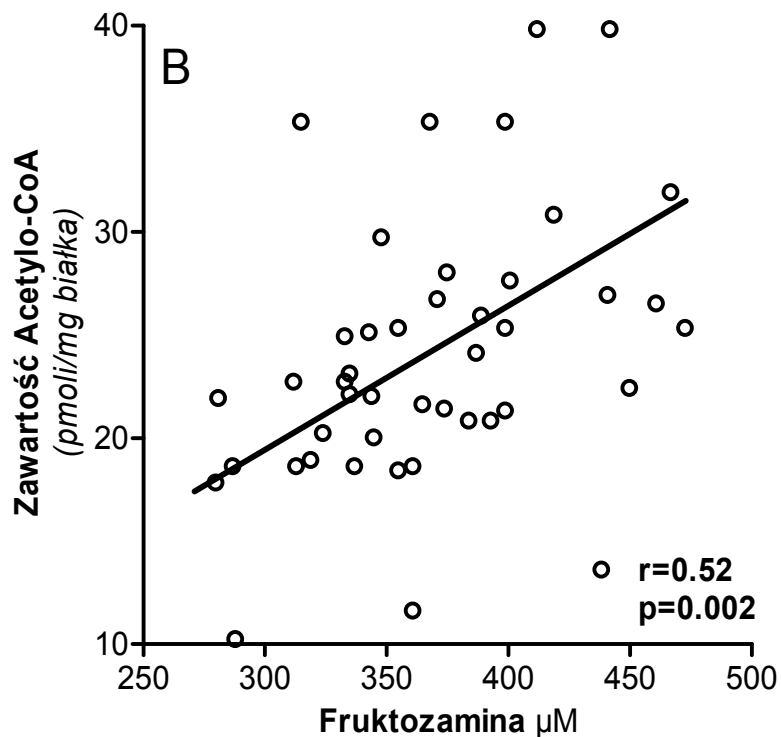
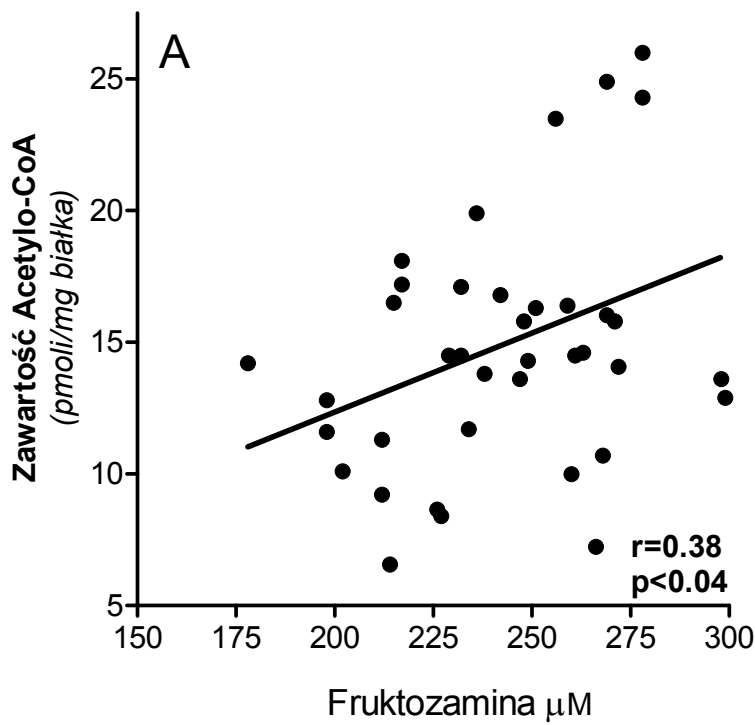
Nie wykazano różnic w zawartości acetylo-CoA w całych płytkach i ich frakcjach subkomórkowych u osób z typem 1 i 2 cukrzycy (Ryc. 3, Tabela 5). Dlatego w doświadczeniach z inhibitorami i aktywatorami metabolizmu acetylo-CoA oraz przy obliczeniach współczynnika korelacji brano pod uwagę połączone wyniki obu grup pacjentów (Ryc. 4).



Ryc. 3. Dystrybucja zawartości całkowitego acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą (n=liczba badań, wykonanych podwójnie). Znamiennie różne od wartości w odpowiedniej grupie osób zdrowych: \* $p < 0.0001$ .

### 5.2.2. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu, a zawartością acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

Wykazano znamioną korelację pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu i zawartością całkowitego acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych (Ryc. 4 A) i osób z cukrzycą (Ryc. 4 B). Znamienność tej korelacji była wyższa u pacjentów z cukrzycą ( $p < 0.002$ ) niż u osób zdrowych ( $p < 0.04$ ) (Ryc. 4 A i B).



Ryc. 4. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu a zawartością acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych (A) i z cukrzycą (B). Dane z Ryc. 2 i 4, A-37, B-48 par pomiarów.

### 5.3. Aktywność enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

W poprzednich pracach wykazano istnienie współzależności między poziomem acetylo-CoA, a aktywnością kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą (Skibowska i wsp. 2000, 2003). Dlatego w tej pracy zbadano wpływ cukrzycy na aktywność innych enzymów związanych z regulacją przemiany glukozy, produkcji energii i syntezy kwasów tłuszczowych w krwinkach płytkowych (Tabela 6).

Tabela 6. Aktywność enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i osób z cukrzycą.

Enzym	Płytki osób zdrowych	Płytki osób z cukrzycą
	Aktywność specyficzna (nmoli/min/mg białka)	
Syntaza cytrynianowa	39.2±1.0 (20)	44.8±0.7 (23)
Akonitaza	8.9±0.9 (13)	11.8±0.7* (14)
Dehydrogenaza α-ketoglutaranowa	2.8±0.4 (14)	3.8±0.3* (15)
Liaza ATP-cytrynianowa	3.0±0.3 (12)	4.5±0.3* (12)
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa	70.7±4.0 (23)	82.9±3.9* (21)
Syntetaza kwasów tłuszczowych	1.42±0.10 (12)	2.29±0.20* (15)

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 12-23 badań wykonanych podwójnie (liczba badań podana w nawiasach). Znamienne różne od krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.05.

Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, enzymu dostarczającego NADPH do redukcji glutationu i syntezy kwasów tłuszczowych w krwinkach płytkowych osób zdrowych wynosiła 70.7 nmola/min/mg białka. Cukrzyca powodowała 17% wzrost jej aktywności w porównaniu z krwinkami osób zdrowych (Tabela 6). Równocześnie w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą obserwowano 61% wzrost aktywności

syntetazy kwasów tłuszczowych, pośrednio biorącej udział w syntezie tromboksanów i lipidowych czynników aktywacyjnych (Tabela 6). Również aktywności dwóch enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych: dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranowej i akonitazy były w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą odpowiednio o 33% i 37% wyższe niż u osób zdrowych (Tabela 6). Natomiast aktywność syntazy cytrynianowej nie ulegała zmianie (Tabela 6). Z kolei aktywność liazy ATP-cytrynianowej, enzymu zaangażowanego w pośredni transport acetylo-CoA z przedziału mitochondrialnego do cytoplazmatycznego, w krwinkach płytkowych w cukrzycy była o 50% wyższa niż w grupie osób zdrowych (Tabela 6).

#### 5.4. Zawartość glukozy-6-fosforanu w krwinkach płytkowych

Poziom glukozy-6-fosforanu jest wypadkową szybkości jego syntezy przez heksokinazę i zużycia w dalszych etapach glikolizy i szlaku pentozomonofosforanowego.

Tabela 7. Zawartość glukozy-6-fosforanu w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Warunki	Płytki osób zdrowych	Płytki osób z cukrzycą
	Glukozy-6-fosforan ( <i>pmoli/mg białka</i> )	
Bez aktywacji (n=12)	561±31 (421-738)	373±31* (193-601)
Aktywacja trombiną (n=7)	325±32 <sup>†</sup> (175-463)	200±19** <sup>†</sup> (67.2-289)

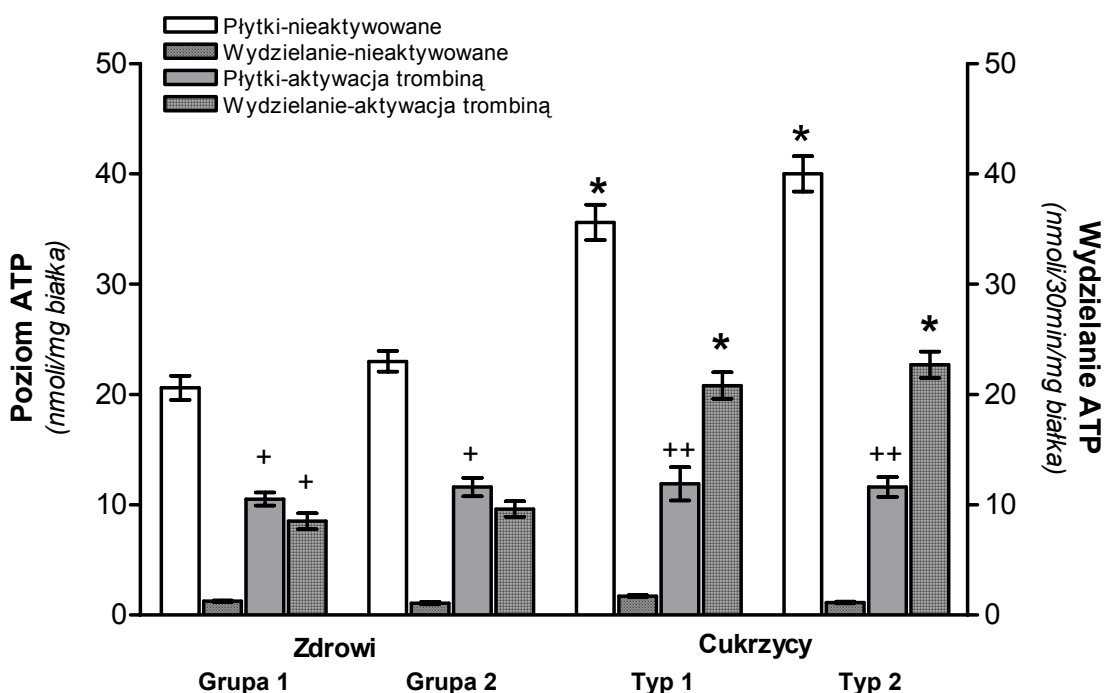
Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7-12 badań. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1 JM/ml trombiną, w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49). Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ ; od warunków bez aktywacji <sup>†</sup> $p < 0.05$ .

Zawartość glukozy-6-fosforanu w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą wynosiła 373 pmole/mg białka i była niższa o 34% w porównaniu z krwinkami płytkowymi osób zdrowych (Tabela 7). Po aktywacji krwinek płytkowych obserwowano znamienne spadki poziomu glukozy-6-fosforanu odpowiednio o 42% i 44% w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą (Tabela 7).



### 5.5. Zawartość i uwalnianie ATP i ADP w krwinkach płytkowych

W warunkach spoczynkowych zawartość ATP w krwinkach płytkowych osób zdrowych grupy 1 i 2 wynosiła odpowiednio 20.6 i 23.0 nmole/mg białka. U osób z cukrzycą typu 1 i 2 poziom ATP w płytkach nieaktywowanych był o około 74% wyższy niż u osób zdrowych (Ryc. 5). Nie obserwowano różnic w śladowym wydzielaniu ATP z płytek w warunkach spoczynkowych pomiędzy odpowiadającymi sobie grupami osób zdrowych i z cukrzycą. Po aktywacji trombiną zawartość ATP w płytkach obu grup osób zdrowych zmniejszała się o około 50%, a w płytkach osób z cukrzycą typu 1 i 2 o ponad 67% (Ryc. 5). Równocześnie bezwzględna ilość ATP wydzielonego podczas aktywacji krwinek płytkowych była dwukrotnie większa u osób z cukrzycą typu 1 i 2 w porównaniu do krwinek płytkowych odpowiednich grup osób zdrowych (Ryc. 5).

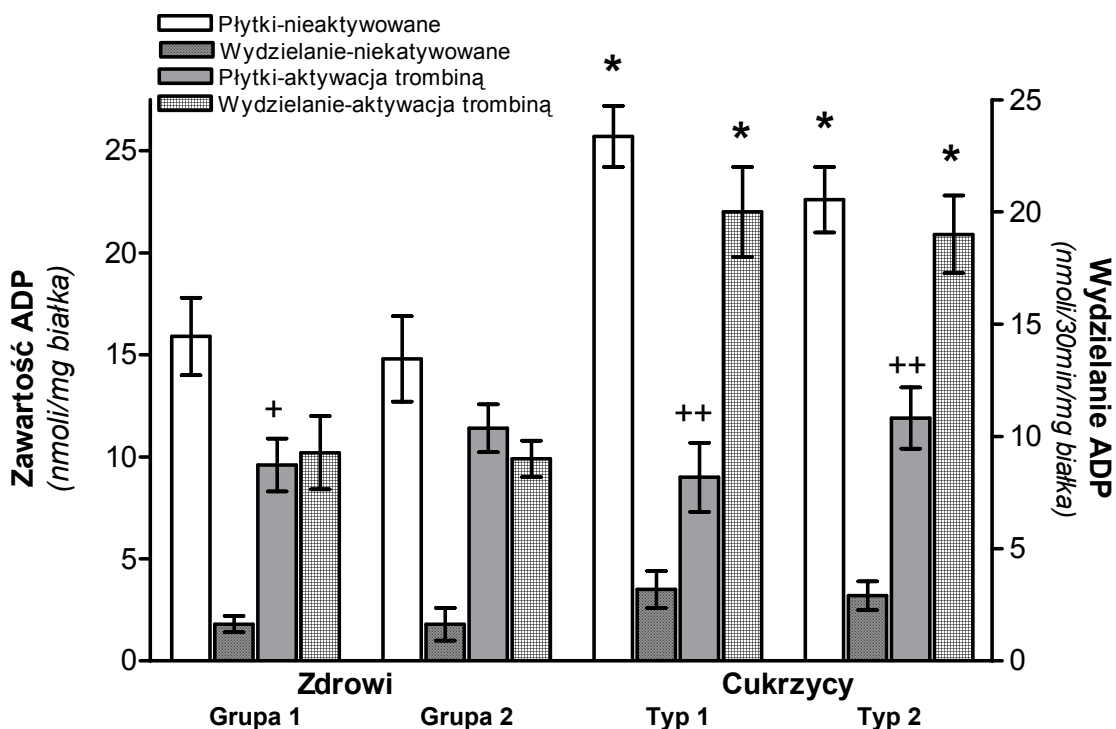


Ryc. 5. Zawartość i uwalnianie ATP z krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 9 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1JM/ml trombiny, w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49). Znamienne różnie od: krwinek płytkowych osób zdrowych odpowiedniej grupy \* $p < 0.0001$ ; od odpowiednich warunków spoczynkowych <sup>+</sup> $p < 0.005$ , <sup>++</sup> $p < 0.0001$ .

W efekcie poziom ATP w aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą obniżał się do wartości zbliżonych do poziomu ATP w zaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych (Ryc.5). Sumaryczny średni odzysk ATP w środowiskach

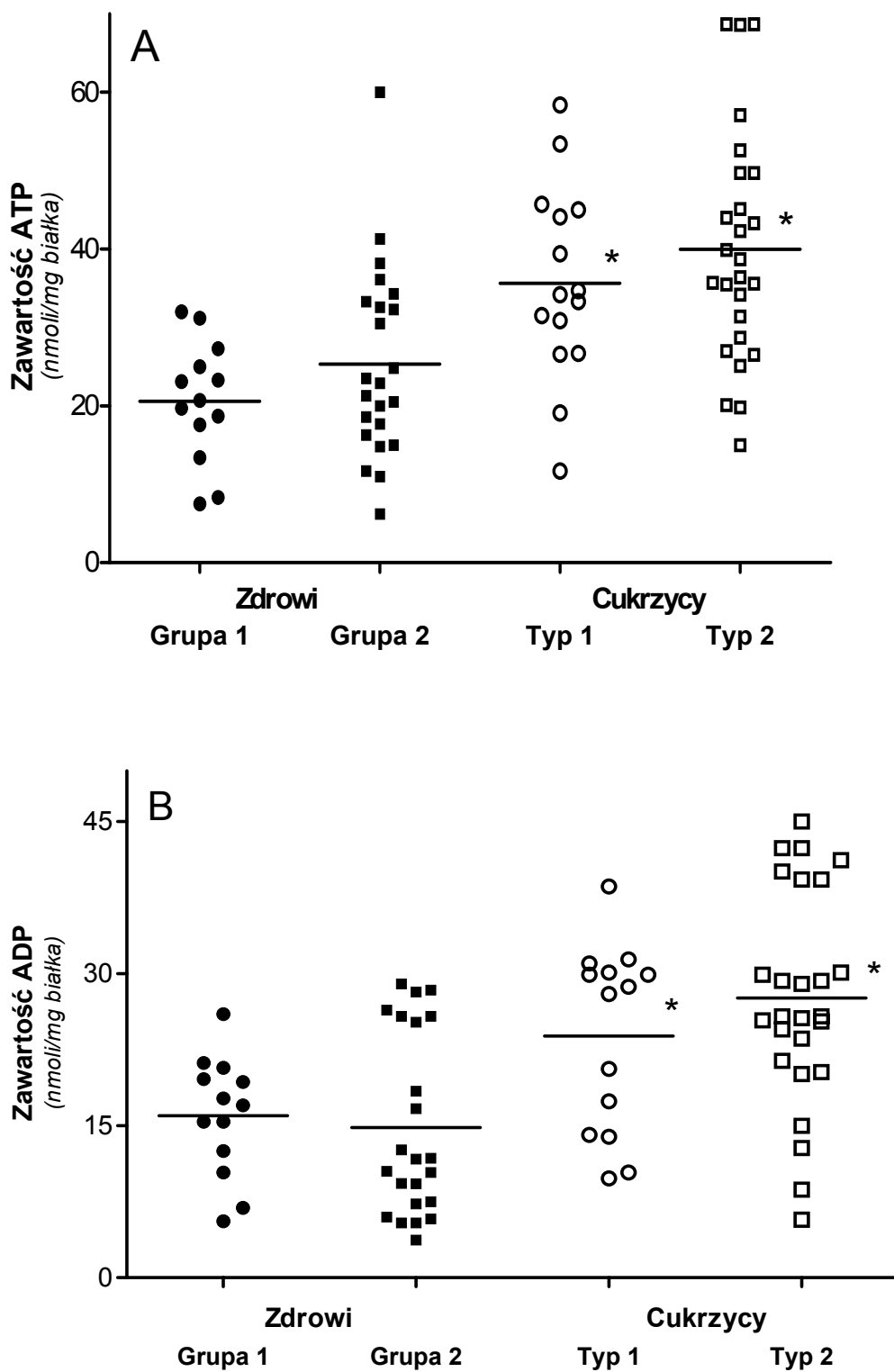
inkubacyjnych i krwinkach płytkowych po aktywacji trombiną w stosunku do warunków bez aktywacji wynosił 87% dla osób zdrowych, a dla krwinek płytkowych osób z cukrzycą średnio 86% (Ryc. 5).



Ryc. 6. Zawartość i uwalnianie ADP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 9 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49). Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych odpowiedniej grupy \* $p < 0.0001$ ; od warunków bez aktywacji: + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.005$ .

Zawartość ADP w krwinkach płytkowych grupy 1 i 2 osób zdrowych w warunkach spoczynkowych wynosiła odpowiednio 15.9 i 14.8 nmoli/mg białka, a w krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 była wyższa odpowiednio o 62% i 54% (Ryc. 6). ADP wydzielony z krwinek płytkowych w warunkach spoczynkowych stanowił około 11% i 14% zawartości ADP w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą (Ryc. 6). Po aktywacji trombiną obserwowano spadek zawartości ADP w płytkach odpowiednio o 40% i 23% w grupie 1 i 2 osób zdrowych oraz odpowiednio o 65% i 47% w płytkach osób z typem 1 i 2 cukrzycy (Ryc. 6). Całkowita ilość ADP wydzielonego z krwinek płytkowych osób z cukrzycą po ich aktywacji była dwukrotnie wyższa w porównaniu do aktywowanych płytek osób zdrowych (Ryc. 6).



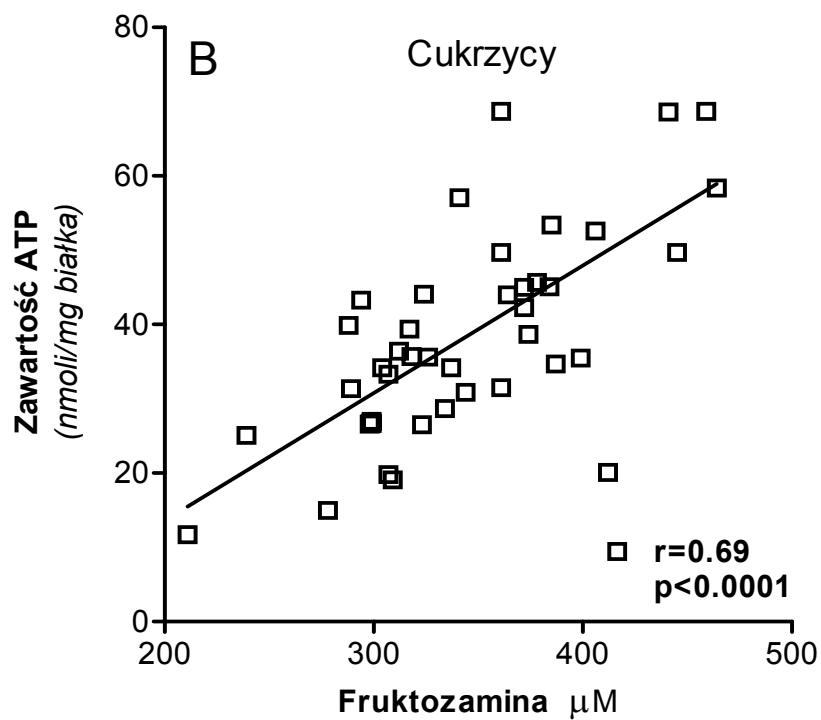
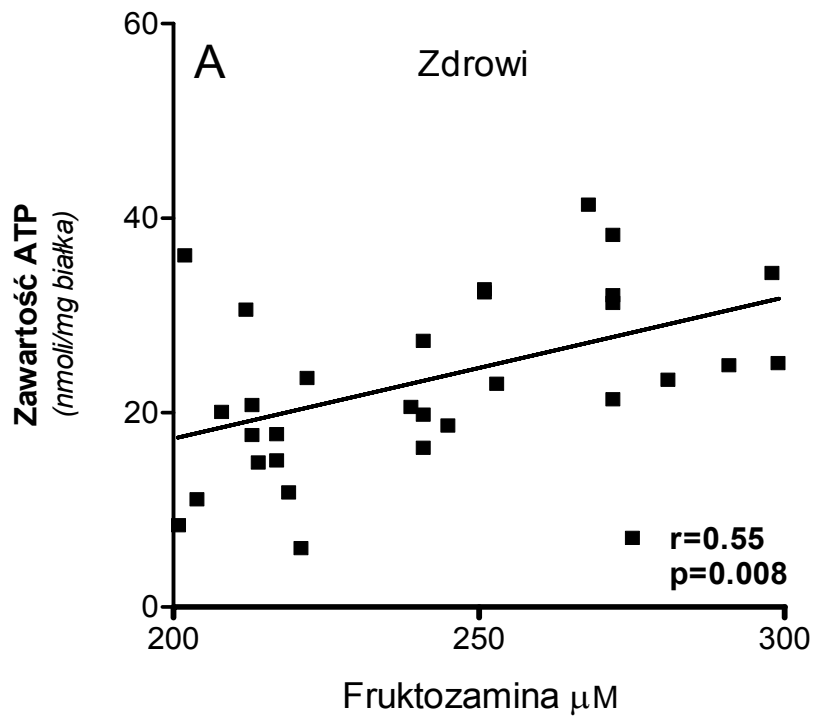
Ryc. 7. Dystrybucja zawartości ATP (A) i ADP (B) w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę (n=13-26)

Znamiennie różne od odpowiednich grup płytek krwi osób zdrowych \* $p < 0.0001$ .

Nie wykazano różnic między zawartością ATP i ADP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych grup 1 i 2 osób zdrowych oraz różnic pomiędzy krwinkami płytkowymi obu grup pacjentów z cukrzycą (Ryc. 7). Dlatego też do badań wpływu inhibitorów i aktywatorów metabolizmu energetycznego na zawartość nukleotydów oraz badań korelacji, wyniki te zostały połączone w pojedyncze grupy krwinek płytkowych osób zdrowych i osób z cukrzycą (Ryc. 8 A i B, 18, 19). Sumaryczny średni odzysk ADP w środowiskach inkubacyjnych i płytkach aktywowanych w stosunku do warunków bez aktywacji wynosił 109% dla grupy osób zdrowych, a 116% dla grupy osób z cukrzycą (Ryc. 6).

#### 5.5.1. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu i zawartością ATP w krwinkach płytkowych

Wykazano znamienne korelację pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu i zawartością ATP w krwinkach płytkowych zarówno osób zdrowych, jak i z cukrzycą (Ryc. 8 A i B). Znamienność korelacji była wyższa w grupie osób z cukrzycą.



Ryc. 8. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu a zawartością ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych (A, 37 par wyników) i pacjentów z cukrzycą (B, 41 par wyników).

## 5.6. Wpływ cukrzycy na funkcję krwinek płytkowych

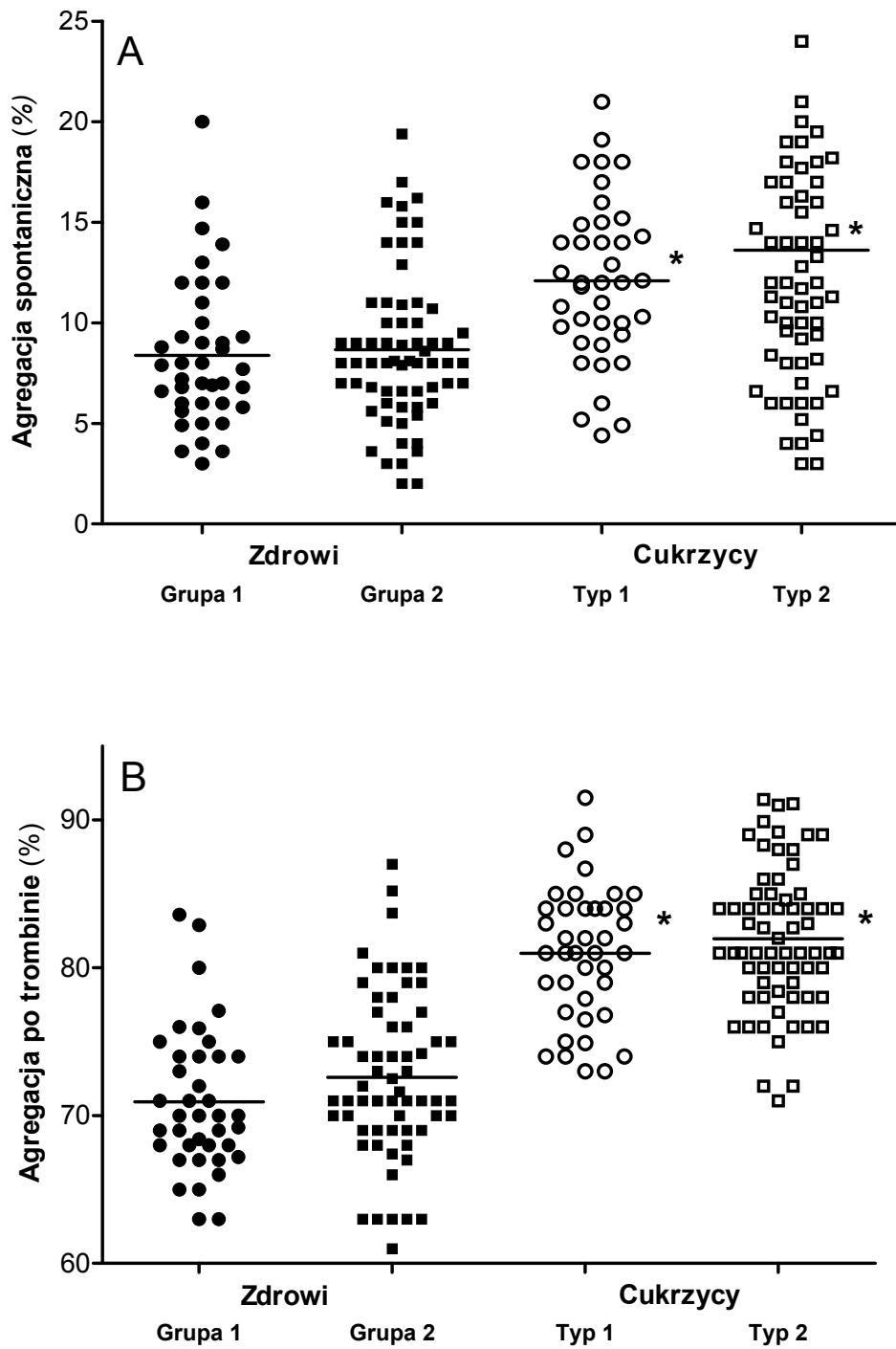
### 5.6.1. Wpływ cukrzycy na agregację krwinek płytkowych

W grupie 1 i 2 osób zdrowych agregacja spoczynkowa krwinek płytkowych wynosiła odpowiednio 8.3% i 8.7% . U pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 agregacja spontaniczna krwinek płytkowych była wyższa odpowiednio o 46% i 54% (Tabela 8), (Ryc. 9). Po aktywacji trombiną agregacja krwinek płytkowych osób zdrowych grup 1 i 2 wynosiła odpowiednio 70.8% i 72.6%. U osób z cukrzycą była ona o około 14% wyższa niż u osób zdrowych (Tabela 8). Nie wykazano różnic w agregacji spoczynkowej i po aktywacji trombiną pomiędzy obiema grupami osób z cukrzycą i osób zdrowych (Ryc. 9 A i B). Dlatego też, w dalszych badaniach nad wpływem aktywatorów i inhibitorów oraz w obliczeniach korelacji łączono obie grupy krwinek płytkowych osób zdrowych w jedną grupę (Tabela 10, Ryc. 20, 26, 29).

Tabela 8. Agregacja krwinek płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę.

Warunki	Zdrowi		Cukrzycy	
	Grupa 1	Grupa 2	Typ 1	Typ 2
Bez aktywacji n=32-36	8.3±0.5 (3-20)	8.7±0.2 (2-19)	12.1±0.6* (4-21)	13.5±0.7* (3-29)
Aktywacja trombiną n=39-65	70.8±0.7 <sup>†</sup> (63-84)	72.6±0.6 <sup>†</sup> (61-87)	80.7±0.6* <sup>†</sup> (73-92)	82.0±0.52* <sup>†</sup> (71-91)

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 32-65 badań wykonanych podwójnie. W nawiasach podano zakres uzyskanych wartości pomiarowych. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1JM/ml trombiny. Znamiennie różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.001; warunków spoczynkowych <sup>†</sup>p<0.001.



Ryc. 9. Dystrybucja wyników badań agregacji spontanicznej (A) i po aktywacji trombiną (B) w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą (n jak w Tabeli 8).

Znamiennie różne od odpowiedniej grupy osób zdrowych: \* $p < 0.001$ .

### 5.6.2. Wpływ cukrzycy na akumulację TBARS w krwinkach płytkowych.

W warunkach spoczynkowych akumulacja TBARS w krwinkach płytkowych obu grup osób z cukrzycą była o ponad 40% wyższa w porównaniu z odpowiednimi grupami płytek osób zdrowych (Tabela 9). Trombina powodowała ponad 3-4 krotny wzrost akumulacji TBARS we wszystkich grupach doświadczalnych. Po aktywacji trombiną akumulacja TBARS w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą była o około 30% wyższa niż w odpowiednich grupach osób zdrowych (Tabela 9). Nie wykazano różnic w syntezie TBARS pomiędzy płytkami osób z cukrzycą typu 1 i 2 oraz pomiędzy 1 i 2 grupą kontrolną zarówno w warunkach spoczynkowych, jak i po aktywacji (Ryc.10). Dlatego w doświadczeniach z użyciem aktywatorów i inhibitorów oraz przy obliczaniu korelacji podgrupy te łączono w pojedyncze grupy osób zdrowych i z cukrzycą (Ryc. 11, 21, 30, Tabela 10).

Tabela 9. Akumulacja TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę.

Warunki	Zdrowi		Cukrzycy	
	Grupa 1	Grupa 2	Typ 1	Typ 2
	<i>Akumulacja TBARS (nmoli/10 min/mg białka)</i>			
Spoczynkowe n=32-36	0.54±0.03 (0.26-0.84)	0.55±0.02 (0.25-0.94)	0.77±0.03* (0.51-1.32)	0.79±0.02* (0.44-1.23)
Aktywacja trombiną n=32-36	2.18±0.07 <sup>†</sup> (1.25-3.16)	2.18±0.06 <sup>†</sup> (1.23-3.32)	2.91±0.03* <sup>†</sup> (2.02-3.6)	2.87±0.06* <sup>†</sup> (1.59-3.23)

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 32-36 badań wykonanych podwójnie. W nawiasach podano zakresy uzyskanych wyników. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1JM/ml trombiny. Znamienne różne od: osób zdrowych w odpowiedniej grupie \* p<0.001; od warunków spoczynkowych <sup>†</sup>p<0.001.





### 5.6.3. Korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy i funkcją krwinek płytkowych.

Wykazano istnienie znamiennej korelacji pomiędzy stężeniem fruktozaminy i zdolnością krwinek płytkowych osób z cukrzycą do agregacji i syntezy TBARS w warunkach spoczynkowych oraz po aktywacji trombiną (Tabela 10). Natomiast w grupie osób zdrowych znamiennej korelację wykazano jedynie pomiędzy stężeniem fruktozaminy i akumulacją TBARS w obu stanach czynnościowych (Tabela 10).

Tabela 10. Korelacja między stężeniem fruktozaminy i funkcją krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Parametr	Fruktozamina	Fruktozamina
	Zdrowi (r)	Cukrzycey (r)
Agregacja spontaniczna	0.28	0.43*
Agregacja po aktywacji trombiną	0.21	0.45*
Akumulacja TBARS spoczynkowa	0.36*	0.51**
Akumulacja TBARS po aktywacji trombiną	0.41*	0.48*

Wyniki korelacji obliczono z 28-31 par pomiarów (Ryc. 2 AB, Ryc. 10 AB, 11 AB). Akumulacja TBARS była wyrażona jako nmole/10min/mg białka, agregacja w %, a stężenie fruktozaminy w  $\mu\text{molach/l}$ . Korelacja statystycznie znamiennej: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 5.6.4. Korelacja pomiędzy poziomem acetylo-CoA w płytkach i funkcją krwinek płytkowych

Wykazano istnienie znamiennej korelacji pomiędzy poziomem acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą, a agregacją aktywowaną trombiną oraz akumulacją TBARS w warunkach spoczynkowych jak i po aktywacji (Tabela 11). Natomiast w krwinkach płytkowych osób zdrowych znamiennej korelację wykazano jedynie pomiędzy poziomem acetylo-CoA, a akumulacją TBARS po aktywacji trombiną (Tabela 11).

Tabela 11. Korelacja między poziomem acetylo-CoA a agregacją i akumulacją TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Parametr	Płytki nieaktywowane	
	Acetylo-CoA Zdrowi (r)	Acetylo-CoA Cukrzycy (r)
Agregacja spontaniczna	0.34	0.18
Agregacja po aktywacji trombiną	0.11	0.52*
Akumulacja TBARS spoczynkowa	0.33	0.56*
Akumulacja TBARS po aktywacji trombiną	0.53*	0.68**

Korelacja obliczona z 26-35 par pomiarów (Ryc.5, 10, 11). Akumulacja TBARS była wyrażona jako nmole/10min/mg białka, agregacja w %, a poziom acetylo-CoA w nmolach/mg białka. Korelacja statystycznie znamienne: \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.0001$ .

W grupie osób z cukrzycą wykazano istnienie znamiennej korelacji pomiędzy poziomem acetylo-CoA w płytkach nieaktywowanych, a agregacją aktywowaną trombiną oraz akumulacją TBARS w warunkach spoczynkowych i po aktywacji (Tabela 11). Natomiast w krwinkach płytkowych osób zdrowych znamiennej korelacji wykazano jedynie pomiędzy poziomem acetylo-CoA a akumulacją TBARS po aktywacji trombiną (Tabela 11).

#### 5.6.5. Korelacje między zawartością ATP i ADP w płytkach krwi a funkcją krwinek płytkowych

W krwinkach płytkowych osób z cukrzycą wykazano istnienie znamiennej korelacji pomiędzy zawartością ATP, ADP i sumą ATP+ADP, a akumulacją TBARS i agregacją w warunkach spoczynkowych (Tabela 12). Po aktywacji trombiną zwiększenie wartości agregacji i akumulacji TBARS w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą korelowało z zawartością ATP i sumą ATP i ADP w płytkach krwi nieaktywowanych (Tabela 12). Natomiast w krwinkach płytkowych osób zdrowych znamiennej korelacji istniała

jedynie pomiędzy zawartością ADP w płytkach nieaktywowanych a agregacją spontaniczną (Tabela 12).

Tabela 12. Korelacja pomiędzy zawartością ATP i ADP a funkcją krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Parametr	ATP (r)	ADP (r)	ATP +ADP (r)
<i>Zdrowi</i>			
Akumulacja TBARS spoczynkowa	0.04	0.01	0.03
Akumulacja TBARS po aktywacji trombiną	- 0.22	- 0.17	0.32
Agregacja spontaniczna	0.19	0.48**	0.32
Agregacja po aktywacji trombiną	-0.32	-0.25	-0.34
<i>Cukrzycy</i>			
Akumulacja TBARS spoczynkowa	0.53***	0.58**	0.67**
Akumulacja TBARS po aktywacji trombiną	0.48***	0.36	0.56***
Agregacja spontaniczna	0.53**	0.55**	0.62*
Agregacja po aktywacji trombiną	0.42***	0.38	0.51*

Korelację obliczono z 13-23 par badań (Ryc. 7, 9, 10). Zawartość ATP i ADP była wyrażona w molach/mg białka; akumulacja TBARS jako nmole/10min/mg białka a agregacja w %. Korelacja statystycznie znamienne: \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.02$ , \*\*\* $p < 0.05$ .

W aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych osób z cukrzycą wykazano istnienie znamiennej korelacji pomiędzy ilością uwolnionego ATP i sumą uwolnionego ATP i ADP a agregacją (Tabela 13). Natomiast akumulacja TBARS korelowała jedynie z ilością uwolnionego ATP (Tabela 13). Nie obserwowano korelacji pomiędzy uwalnianiem nukleotydów, a funkcją aktywowanych trombiną krwinek płytkowych osób zdrowych (Tabela 13).

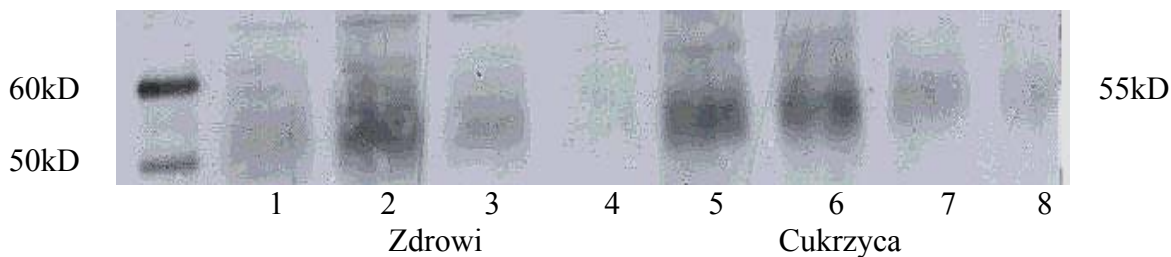
Tabela 13. Korelacja pomiędzy ilością uwolnionego ATP i ADP a funkcją krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Parametr Grupy doświadczalne	$\Delta$ ATP (r)	$\Delta$ ADP (r)	$\Delta$ ATP +ADP (r)
<i>Zdrowi</i>			
Synteza TBARS po trombinie	- 0.17	- 0.23	- 0.29
Agregacja po trombinie	- 0.08	- 0.05	- 0.04
<i>Cukrzycy</i>			
Synteza TBARS po trombinie	0.71*	0.07	0.42
Agregacja po trombinie	0.66**	0.10	0.53***

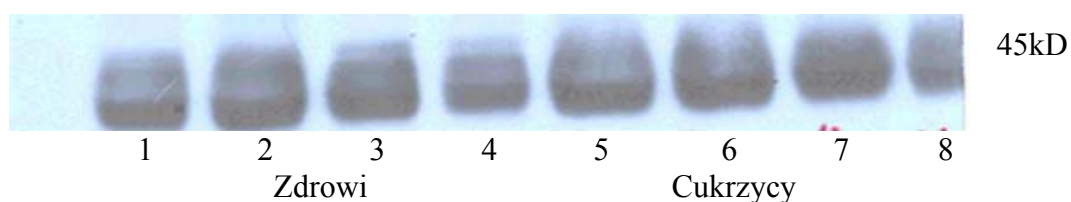
Korelację obliczono z 12-16 par pomiarów (Ryc.8). Zawartość uwolnionego ATP i ADP była wyliczona jako różnica zawartości wewnątrzpłytkowego ATP i ADP w warunkach spoczynkowych i po aktywacji. Ilość uwolnionego ATP i ADP była wyrażona w nmolach/30min/mg białka; akumulacja TBARS jako nmole/10min/mg białka; agregacja w %. Korelacja statystycznie znamienne: \* p<0.005, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.05.

#### 5.7. Zawartość transportera Glut3 w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą

Względna zawartość Glut3 w stosunku do  $\beta$ -aktyny wynosiła odpowiednio 0.47 i 0.42 w krwinkach płytkowych osób zdrowych grupy 1 i 2. Zawartość Glut3 w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą typu 1 i 2 nie różniła się od zawartości tego białka w płytkach osób zdrowych (Ryc. 11 i 12). Nie wykazano znamienych różnic pomiędzy grupami osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą.

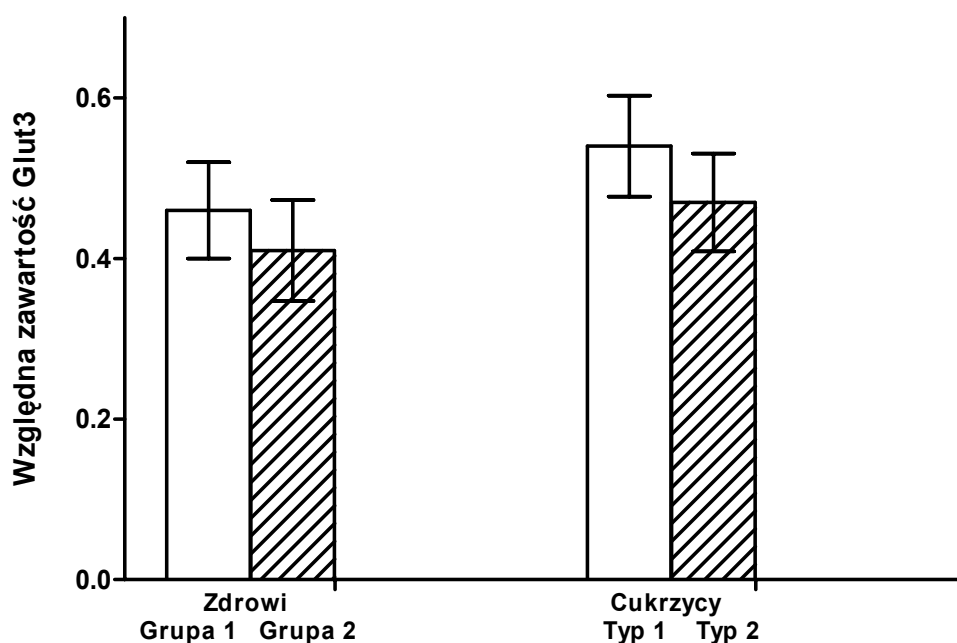


Ryc. 11 A. Zawartość transportera Glut3 w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą. Przykładowe rozdziały Western-blot.



Ryc. 11 B Zawartość  $\beta$ -aktyny w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Ścieżki 1-4 płytki osób zdrowych, 5-8 płytki osób z cukrzycą. Rozdział jest reprezentatywny dla 7-20 badań (Ryc. 12).

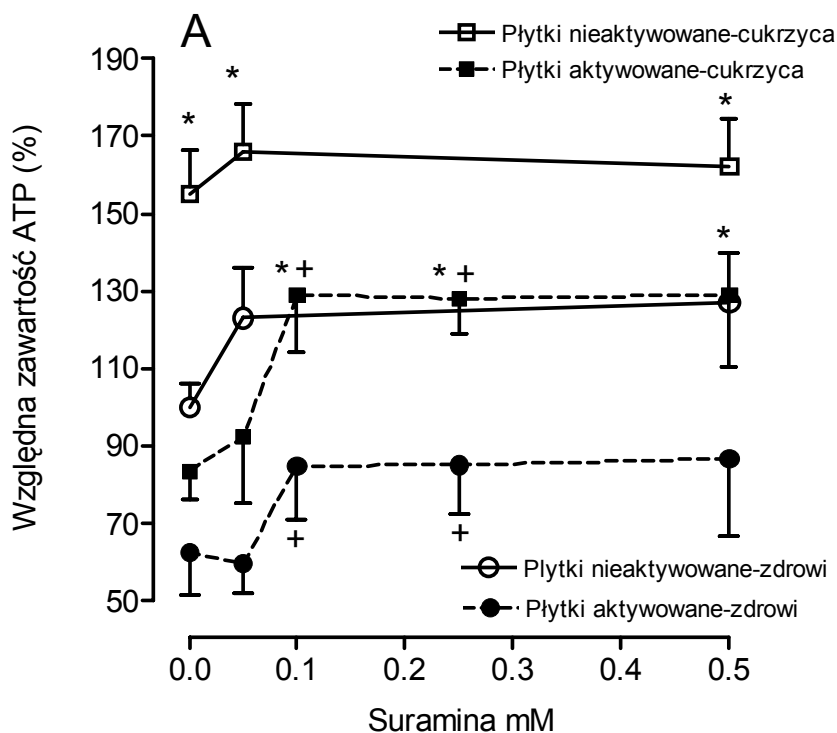


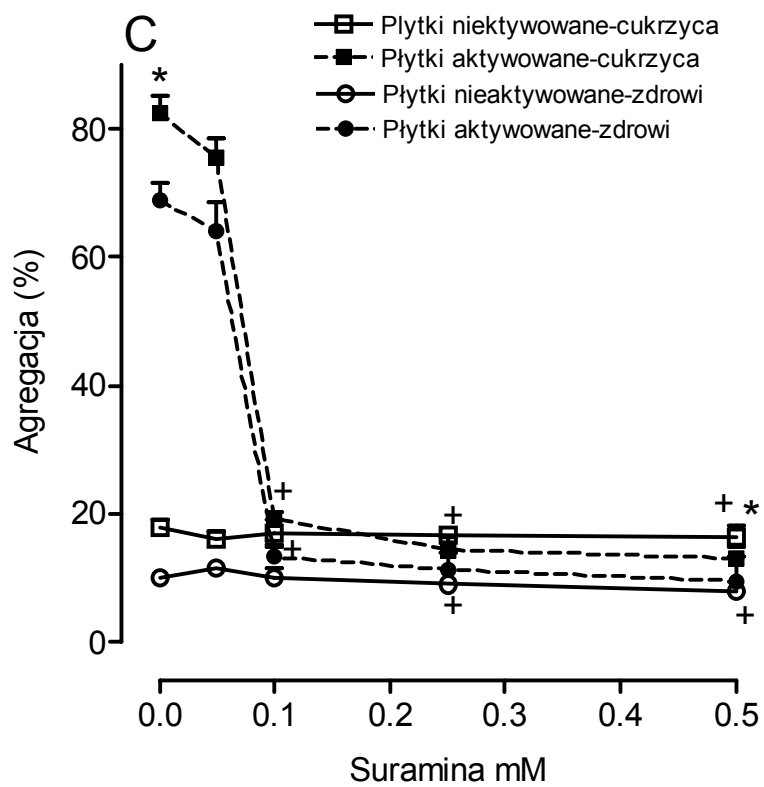
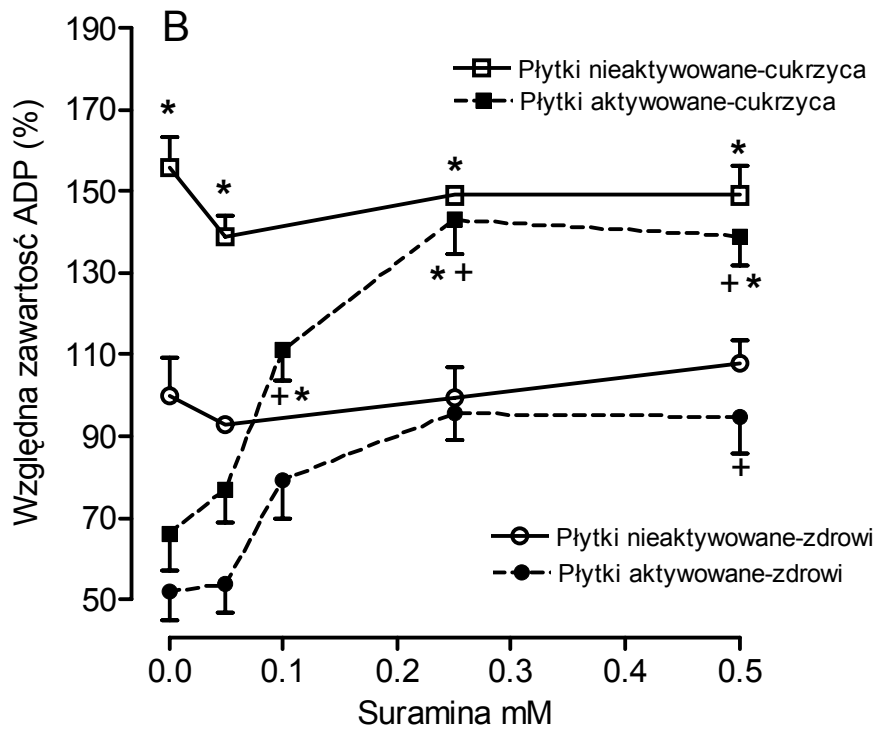
Ryc.12 Względny poziom transportera Glut3 w stosunku do poziomu  $\beta$ -aktyny w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7-20 pomiarów.

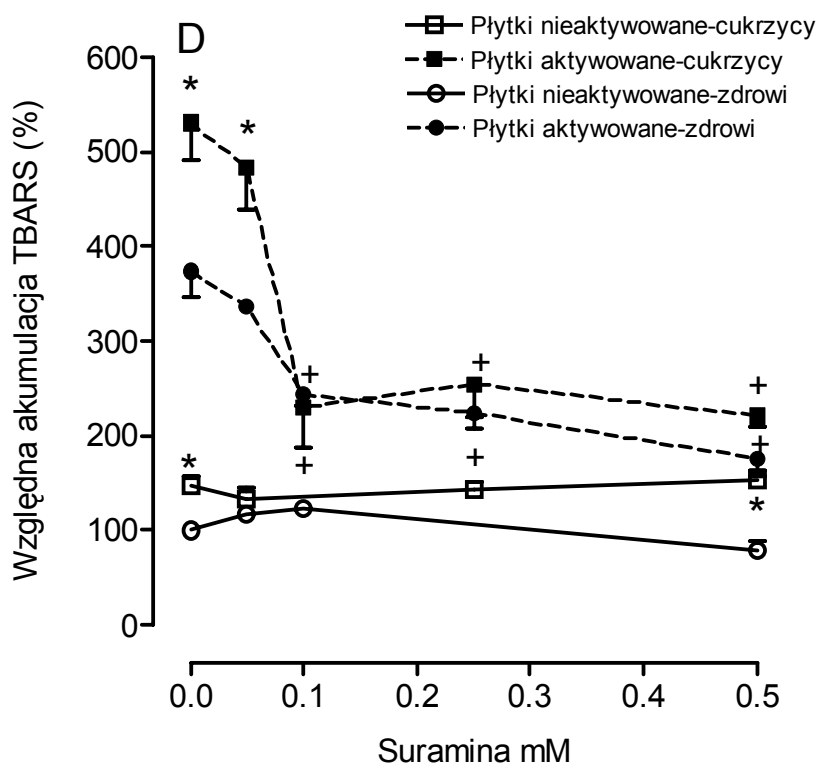
### 5.8. Wpływ suraminy na zawartość ATP, ADP i funkcję krwinek płytkowych

Suramina jest znanym nieselektywnym antagonistą receptorów purynergicznym (Park i Hourani, 1999). Suramina powodowała zależne od stężenia odwrócenie wywołanego aktywacją trombiną obniżenia poziomów ATP i ADP zarówno w płytkach osób zdrowych, jak i z cukrzycą (Ryc. 13 A i B). Natomiast w krwinkach płytkowych nieaktywowanych obu grup, suramina nie powodowała istotnego wzrostu poziomu tych nukleotydów (Ryc. 13 A i B). I tak w aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych 0.1 mM suramina podwyższała zawartość ATP z 62% do 85% a ADP z 52% do 80% ich poziomu w warunkach bez aktywacji (Ryc. 13 A i B). Podwyższenie stężenia suraminy do 0.5 mM nie powodowało dalszego istotnego wzrostu zawartości ATP i ADP w aktywowanych płytkach krwi osób zdrowych. Z kolei w aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą, 0.1 mM suramina zwiększała poziom ATP z 83% do 130% a ADP z 66% do 111% ich poziomu w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. W krwinkach płytkowych osób z cukrzycą wzrost stężenia suraminy do 0.5 mM nie powodował dalszego zwiększenia zawartości ATP i ADP (Ryc. 13 A i B).









Ryc. 13. Zależny od stężenia wpływ suraminy na zawartość ATP (A), ADP (B) oraz agregację (C) i akumulację TBARS (D) w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 5 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (A, B, patrz str. 49). Wartości 100% w płytkach osób zdrowych odpowiada jej poziomowi ATP (A)  $14.9 \pm 1.4$  nmoli/mg białka, ADP (B)  $12.5 \pm 1.9$  nmoli/mg białka, agregacji (C)  $10 \pm 1\%$  i akumulacji TBARS (D)  $0.57 \pm 0.01$  nmoli/10min/mg białka w warunkach spoczynkowych. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.05$ ; od warunków bez suraminy † $p < 0.05$ .

Tak więc, w obecności trombiny poziomy ATP i ADP w płytkach cukrzycowych traktowanych suraminą pozostawały na znamienne wyższym poziomie niż w płytkach osób zdrowych. Suramina nie miała wpływu na zawartość ATP i ADP w warunkach spoczynkowych (Ryc. 13 A i B). Suramina nie powodowała całkowitego odtworzenia poziomu ATP do jego wartości w płytkach nieaktywowanych. Przy 0.5 mM stężeniu suraminy zawartość ATP w aktywowanych płytkach obu grup pozostawała na poziomie około 80% ich poziomu bez aktywacji. Natomiast w przypadku ADP suramina przywracała jego poziom do wartości obserwowanej w płytkach nieaktywowanych (Ryc. 13 A i B).

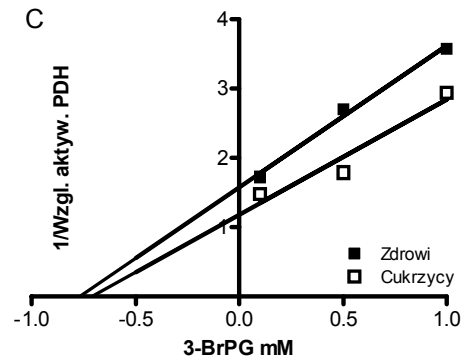
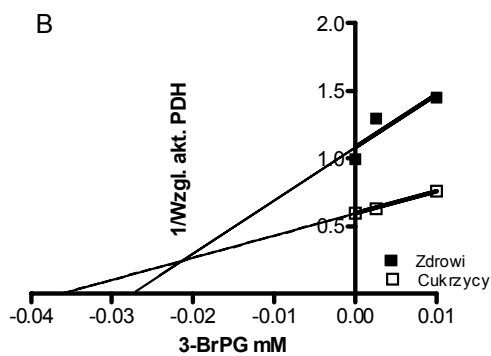
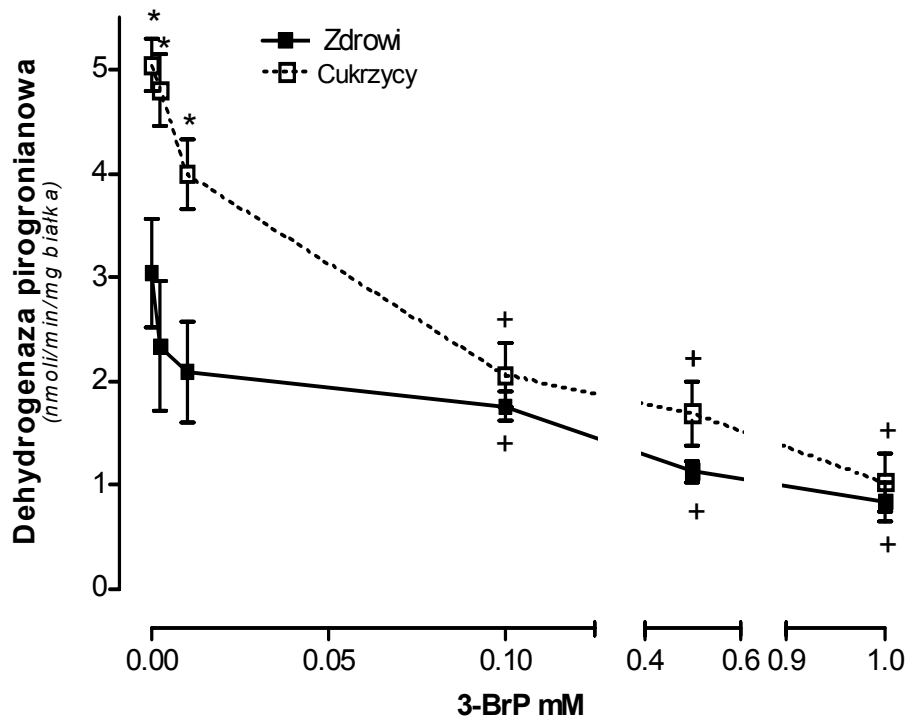
Suramina nie wpływała na akumulację TBARS w warunkach spoczynkowych (Ryc. 13 D). Natomiast hamowała akumulację TBARS w aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą (Ryc. 13 D). W aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą 0.1 mM suramina obniżała akumulację TBARS z 530% do 220% wartości w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. W aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych spadek ten był dwukrotnie niższy. Dalszy wzrost stężenia suraminy do 0.5 mM nie powodował istotnego nasilenia tej inhibicji (Ryc. 13 D). Aktywowana trombiną agregacja krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą była hamowana przez suraminę do wartości agregacji w warunkach spoczynkowych (Ryc. 13 C). Suramina nie zmieniała agregacji spoczynkowej krwinek płytkowych w obu grupach (Ryc. 13 C).

#### 5.9. Wpływ 3-bromopirogronianu (3-BrPG) na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych

3-BrPG jest znanym inhibitorem PDH powodującym zmniejszenie poziomu acetylo-CoA w mózgu (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Burton i wsp. 1995, Dutschke i wsp. 1994). Dlatego inhibitor ten został użyty w tej pracy w badaniach roli acetylo-CoA w aktywacji krwinek płytkowych.

##### 5.9.1. Wpływ stężenia 3-BrPG na aktywność dehydrogenazy pirogronianowej w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą

W środowisku bez 3-BrPG aktywność PDH w homogenatach płytek osób zdrowych i z cukrzycą wynosiła odpowiednio 3.04 i 5.04 nmoli/min/mg białka (Ryc. 14). Zwiększające się stężenia 3-BrPG w środowisku inkubacyjnym powodowały stopniowy spadek aktywności PDH. Dynamika spadku była przy tym różna w obu grupach doświadczalnych. W krwinkach płytkowych osób zdrowych, wzrost stężenia 3-BrPG od 0.1 mM do 1.0 mM powodował względną inhibicję aktywności PDH odpowiednio 30% i 60% (Ryc. 14 A). Natomiast w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą te same stężenia inhibitora powodowały odpowiednio 59% i 84% inhibicję PDH (Ryc. 14 A). W rezultacie przy 1 mM stężeniu 3-BrPG aktywności PDH w obu grupach były podobne (Ryc. 14). Analiza krzywych inhibicji metodą Dixona wykazała ich dwufazowy charakter. Stałe inhibitorowe 3-BrPG dla obu grup doświadczalnych były podobne. Dla niskich stężeń 3-BrPG wynosiły około 0.03mM (Ryc. 14 B), a dla wysokich 0.75 mM (Ryc. 14 C).

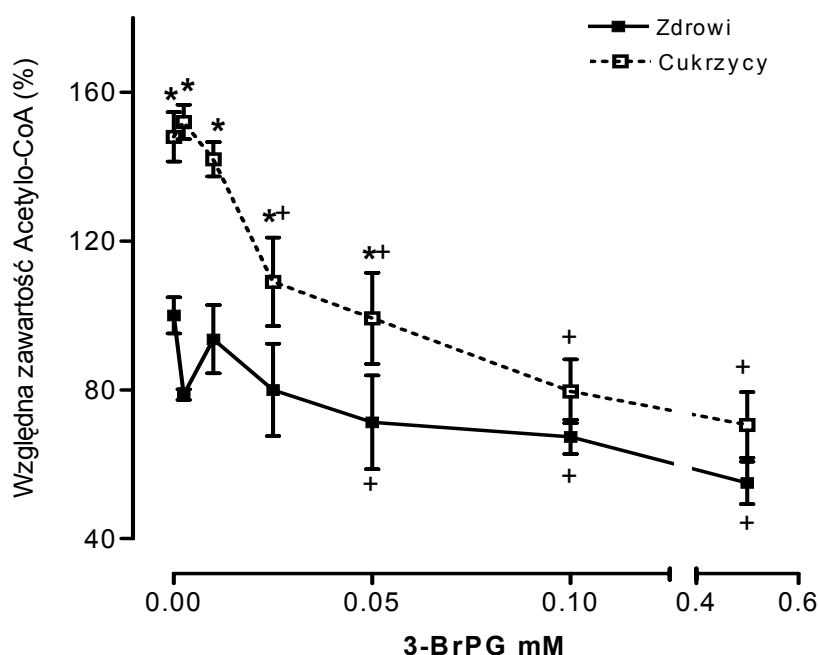


Ryc. 14 Wykres zależności aktywności dehydrogenazy pirogronianowej w homogenatach krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą od stężenia 3-bromopirogronianu (A). Wykresy Dixona inhibicji enzymu przez niskie (B) i wysokie stężenia inhibitora (C).

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3 badań wykonanych podwójnie. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.01$ ; od warunków bez inhibitora  $^+ p < 0.01$ .

### 5.9.2. Wpływ stężenia 3-BrPG na poziom acetylo-CoA

3-BrPG powodował zależny od stężenia spadek poziomu acetylo-CoA zarówno w krwinkach płytkowych osób zdrowych jak i z cukrzycą (Ryc.15). W stężeniu 0.1mM 3-BrPG powodował obniżenie poziomu acetylo-CoA w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą odpowiednio o 33% i 68% (Ryc. 15). Dalszy wzrost stężenia 3-BrPG do 0.5 mM nie powodował istotnego pogłębienia inhibicji (Ryc. 15).

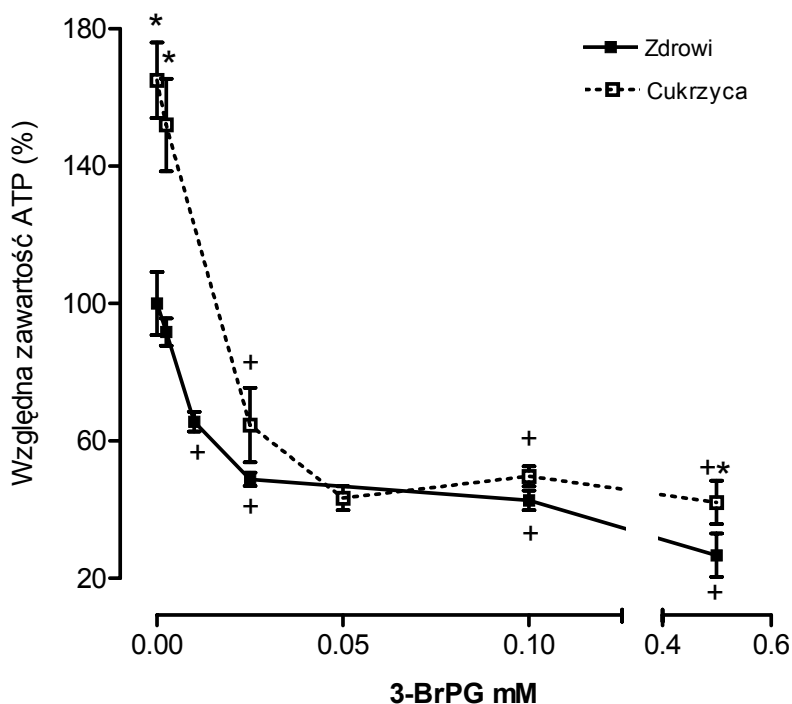


Ryc.15. Wpływ wzrastających stężeń 3-bromopirogronianu na zawartość acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3-11 badań wykonanych podwójnie. Wartość 100% w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych odpowiada poziomowi acetylo-CoA  $12.2 \pm 0.6$  pmola/mg białka. Znamiennie różne od: osób zdrowych \* $p < 0.01$ ; od warunków bez inhibitora + $p < 0.01$ .

### 5.9.3. Wpływ stężenia 3-BrPG na zawartość ATP w krwinkach płytkowych.

Względna zawartość ATP w krwinkach płytkowych osób zdrowych w obecności 0.1 mM 3-BrPG obniżała się o 53%, a w płytkach osób z cukrzycą z wartości 170% do 50% poziomu stwierdzanego w płytkach osób zdrowych (Ryc.16). Zwiększenie stężenia 3-BrPG do 0.5 mM nie powodowało dalszego istotnego spadku zawartości ATP (Ryc. 16).



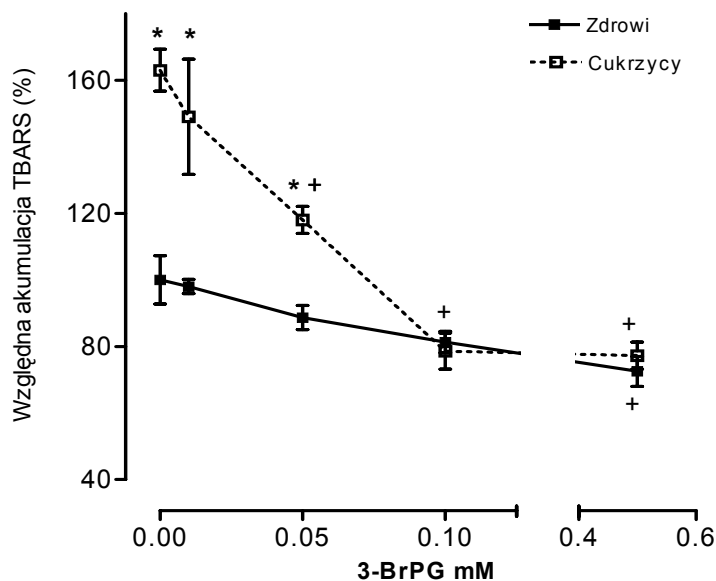
Ryc. 16. Wpływ wzrastających stężeń 3-BrPG na zawartość ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3-11 badań wykonanych podwójnie. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.01$ ; od warunków bez inhibitora  $^+p < 0.01$ . Wartość 100% w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych odpowiada poziomowi ATP  $26.8 \pm 2.0$  nmola/mg białka.

#### 5.9.4. Wpływ stężenia 3-BrPG na funkcję krwinek płytkowych.

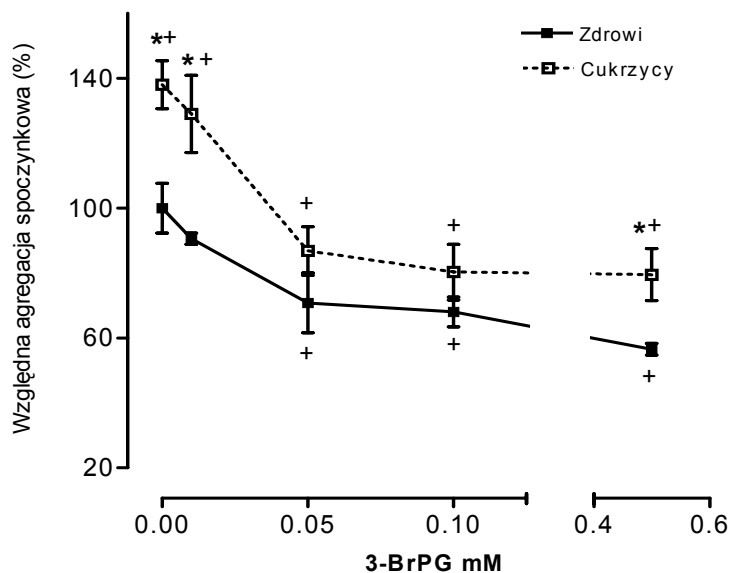
Zwiększające się stężenia 3-BrPG powodowały narastające zahamowanie funkcji nieaktywowanych płytek osób zdrowych (Ryc. 17 i 18). 0.1mM 3-BrPG powodował inhibicję akumulacji TBARS i agregacji odpowiednio o 19% i 26%, a w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą o 58% i 60% (Ryc. 17 i 18). Wzrost stężenia 3-BrPG do 0.5 mM nie powodował dalszego istotnego pogłębienia inhibicji akumulacji TBARS i agregacji (Ryc. 17 i 18).

Na podstawie uzyskanych wyników w dalszych doświadczeniach nad wpływem 3-BrPG na krwinki płytkowe w zależności od stanu ich aktywacji, używano 0.1mM stężenia tego inhibitora.



Ryc. 17. Wpływ wzrastających stężeń 3-BrPG na akumulację TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3-11 badań wykonanych podwójnie. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.01$ ; od warunków bez inhibitora <sup>+</sup> $p < 0.01$ . Wartość 100% odpowiada spoczynkowej akumulacji TBARS w płytkach osób zdrowych  $0.57 \pm 0.09$  nmola/10min/mg białka.



Ryc. 18. Wpływ wzrastających stężeń 3-BrPG na agregację nieaktywowanych krwinek płytkowych.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 3-11 badań. Znamienne różne od: osób zdrowych: \* $p < 0.01$ , od warunków bez inhibitora <sup>+</sup> $p < 0.01$ . Wartość 100% odpowiada agregacji spoczynkowej równej  $10 \pm 1\%$  w płytkach osób zdrowych.

#### 5.9.5. Wpływ 3-BrPG na wewnątrzpłytkową dystrybucję acetylo-CoA w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych

W nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych 0.1 mM 3-BrPG powodował spadek zawartości mitochondrialnego acetylo-CoA o 33% (Tabela 14). Natomiast w nieaktywowanych płytkach osób z cukrzycą spadek zawartości mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA był wyższy i wynosił odpowiednio 68% i 63% (Tabela 14). W rezultacie 3-BrPG powodował obniżenie acetylo-CoA w przedziałach subkomórkowych krwinek płytkowych osób z cukrzycą do poziomu zbliżonego do wartości stwierdzanych w traktowanych inhibitorem płytkach osób zdrowych. W aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych 3-BrPG nie obniżał poziomu acetylo-CoA w mitochondriach i cytoplazmie (Tabela 14). Natomiast w aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą obserwowano znaczne zmniejszenie supresyjnego wpływu 3-BrPG na zawartość acetylo-CoA w obu przedziałach komórkowych (Tabela 14).

Tabela 14. Wpływ 3-BrPG na wewnątrzkomórkową dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

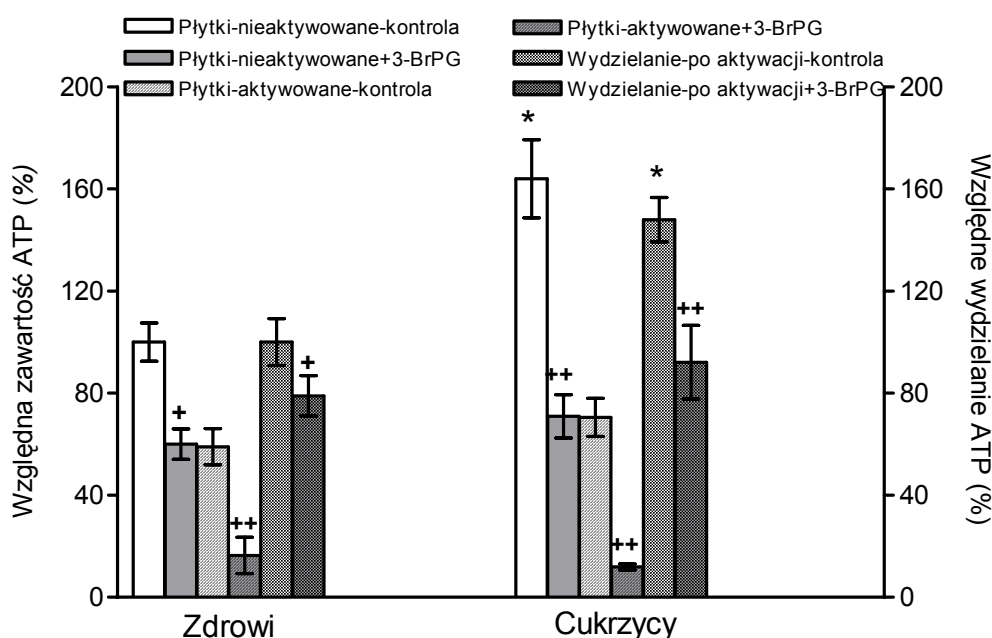
Warunki Fracja płytkowa	Zdrowi Względna zawartość	Cukrzycy acetylo-CoA (%)
<b>Całe płytki</b>		
<i>Nieaktywowane</i>		
Kontrola	100.0±3.9	148.1±7.0*
0.1mM 3-BrPG	67.4±2.3 <sup>‡</sup>	81.4±4.0* <sup>‡</sup>
<i>Aktywowane</i>		
Kontrola	71.4±5.3 <sup>†</sup>	90.6±4.0* <sup>†</sup>
0.1mM 3-BrPG	53.9±4.0	66.6±8.4
<b>Mitochondria</b>		
<i>Nieaktywowane</i>		
Kontrola	100.0±7.0	138.9±5.1*
0.1mM 3-BrPG	67.4±5.2 <sup>‡</sup>	68.1±5.8 <sup>‡</sup>
<i>Aktywowane</i>		
Kontrola	63.7±7.0 <sup>†</sup>	71.2±9.6 <sup>†</sup>
0.1mM 3-BrPG	43.7±9.2	62.4±6.2
<b>Cytoplazma</b>		
<i>Nieaktywowane</i>		
Kontrola	100.0±16	170.0±16*
0.1mM 3-BrPG	82.9±7.7	107±13 <sup>‡</sup>
<i>Aktywowane</i>		
Kontrola	102.3±17	120.0±11 <sup>†</sup>
0.1mM 3-BrPG	84.9±2.0	93.8±4.4 <sup>‡</sup>

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 9-11 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja krwinek płytkowych 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (patrz. str. 49). Wartość 100% odpowiada poziomowi acetylo-CoA: całkowitego 12.2±0.6, mitochondrialnego 8.8±0.7 i cytoplazmatycznego 3.4±0.6 pmoli/mg białka w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. Znamienne różnie od: osób zdrowych \*p<0.01; od warunków bez aktywacji <sup>†</sup>p<0.01; od warunków bez 3-BrPG <sup>‡</sup>p<0.05.



### 5.9.6. Wpływ 3-BrPG na zawartość ATP i ADP w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych

Zawartość ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą wynosiła 160% zawartości tego nukleotydu w płytkach osób zdrowych (Ryc. 19). W nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych 3-BrPG obniżał poziom ATP o 40%. W krwinkach płytkowych osób z cukrzycą spadek ten był dwukrotnie większy. W płytkach aktywowanych obu grup 3-BrPG powodował spadek zawartości ATP do około 20% jego poziomu w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych (Ryc. 19). Równocześnie w aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą, 3-BrPG spowodował ponad dwukrotnie większe zahamowanie wydzielania ATP w porównaniu z płytkami osób zdrowych (Ryc. 19).

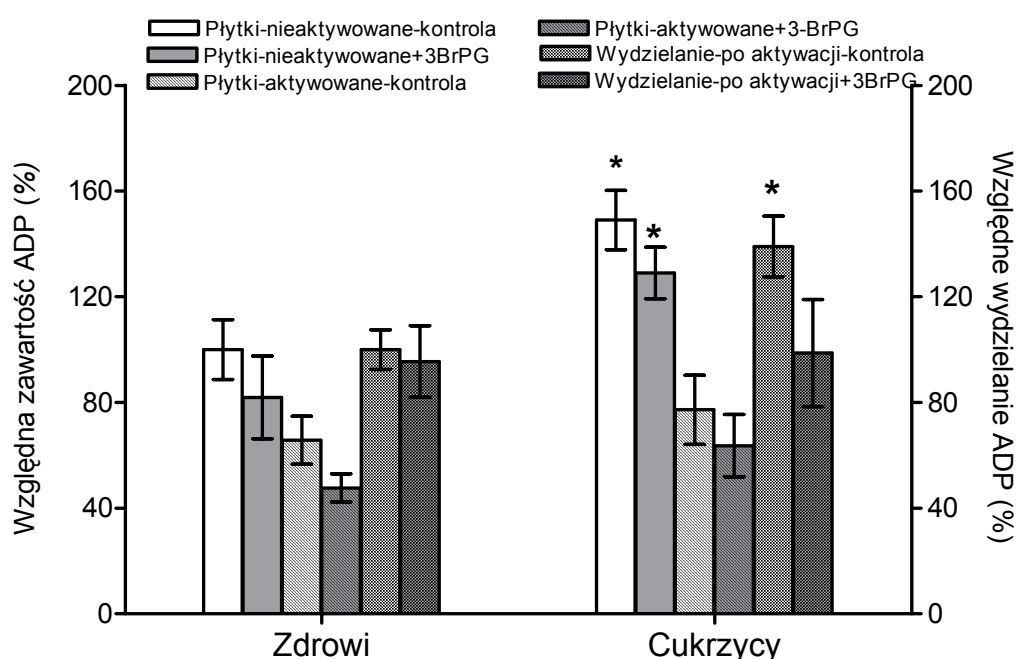


Ryc. 19. Wpływ 3-BrPG na zawartość i wydzielanie ATP w nieaktywowanych i aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7-11 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49), 3-BrPG 0.1mM. Wartość 100% w płytkach osób zdrowych odpowiada poziomowi ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych równemu  $26.8 \pm 2.0$  nmoli/mg białka oraz wydzielaniu ATP z aktywowanych trombiną krwinek płytkowych osób zdrowych równemu  $13.9 \pm 1.1$  nmoli/30min/mg białka. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.005$ ; od warunków bez inhibitora <sup>+</sup> $p < 0.05$ , <sup>++</sup> $p < 0.005$ .

Takie zróżnicowane działanie 3-BrPG na płytki krwi osób zdrowych i z cukrzycą powodowało wyrównanie poziomów ATP w płytkach obu badanych grup zarówno w warunkach spoczynkowych jak i po aktywacji. Zawartość ATP w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą po dodaniu 3-BrPG była więc taka sama jak w krwinkach płytkowych osób zdrowych (Ryc. 19).

3-BrPG nie powodował istotnego spadku zawartości ADP w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i chorych na cukrzycę. Nie miał on również wpływu na uwalnianie ADP z krwinek płytkowych obu grup (Ryc. 20).

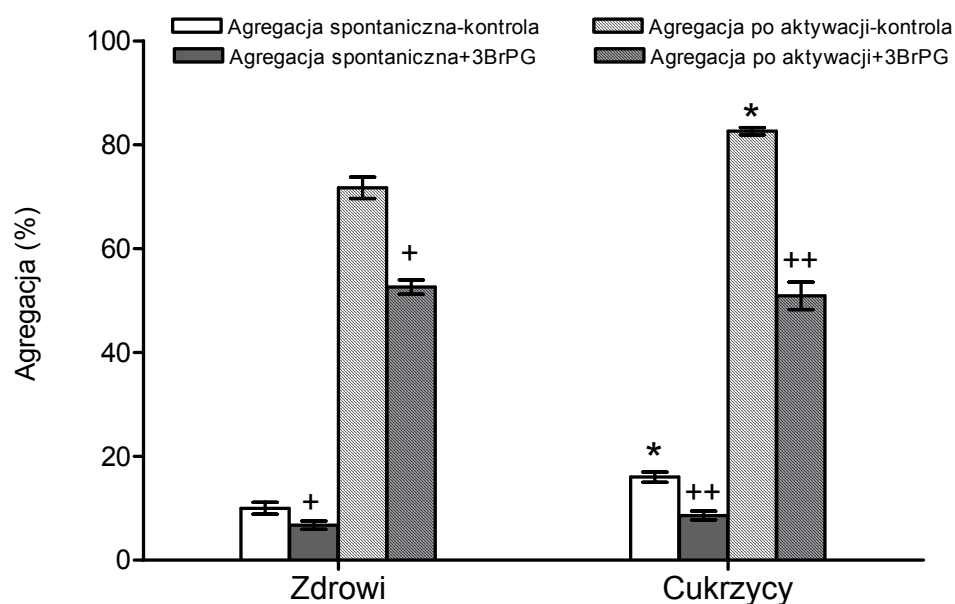


Ryc. 20 Wpływ 3-BrPG na zawartość i uwalnianie ADP w nieaktywowanych i aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7-11 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49), 3-BrPG 0.1mM. Wartość 100% w płytkach osób zdrowych odpowiada poziomowi ADP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych równemu  $18.7 \pm 2.5$  nmoli/mg białka oraz wydzielaniu ADP z aktywowanych trombiną krwinek płytkowych osób zdrowych równemu  $11.4 \pm 0.79$  nmoli/mg białka. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.05$ .

### 5.9.7. Wpływ 3-BrPG na funkcję aktywowanych i nieaktywowanych krwinek płytkowych

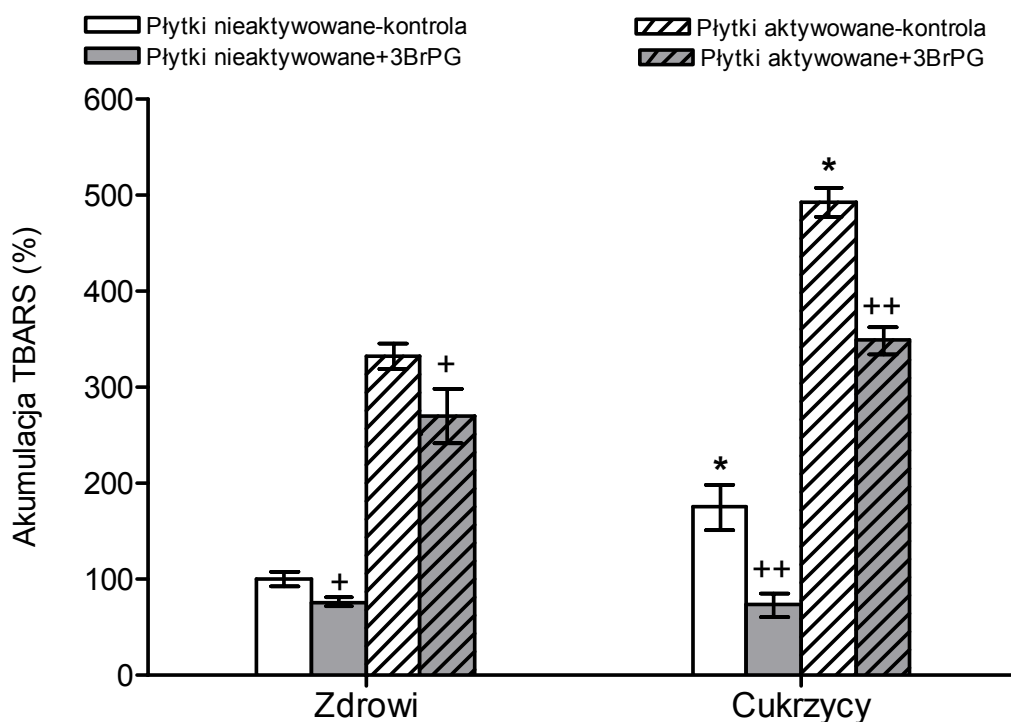
3-BrPG powodował spadek agregacji krwinek płytkowych osób zdrowych w warunkach spoczynkowych i po aktywacji odpowiednio o 32% i 26% (Ryc. 21). Inhibicyjny wpływ 3-BrPG był ponad dwukrotnie większy w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą (Ryc. 21). W konsekwencji 3-BrPG hamował agregację płytek pacjentów z cukrzycą do wartości stwierdzanych w płytkach osób zdrowych (Ryc. 21).



Ryc. 21. Wpływ 3-BrPG na spoczynkową i indukowaną trombiną agregację krwinek płytkowych.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7-11 badań. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny; 3-BrPG 0.1 mM. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.05$ ; od warunków bez inhibitora  $^+ p < 0.05$ ,  $^{++} p < 0.005$ .

Akumulacja TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą była równa 180% akumulacji w płytkach osób zdrowych (Ryc. 22). 3-BrPG obniżał akumulację TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych o 24% i powodował czterokrotnie większą inhibicję ich akumulacji w płytkach osób z cukrzycą (Ryc. 22). Po aktywacji trombiną 3-BrPG powodował zmniejszenie akumulacji TBARS w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą odpowiednio o 19 i 43% (Ryc. 22). W konsekwencji, w obecności tego inhibitora akumulacja TBARS w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą obniżała się do wartości zbliżonej do ich akumulacji w płytkach osób zdrowych (Ryc. 22).



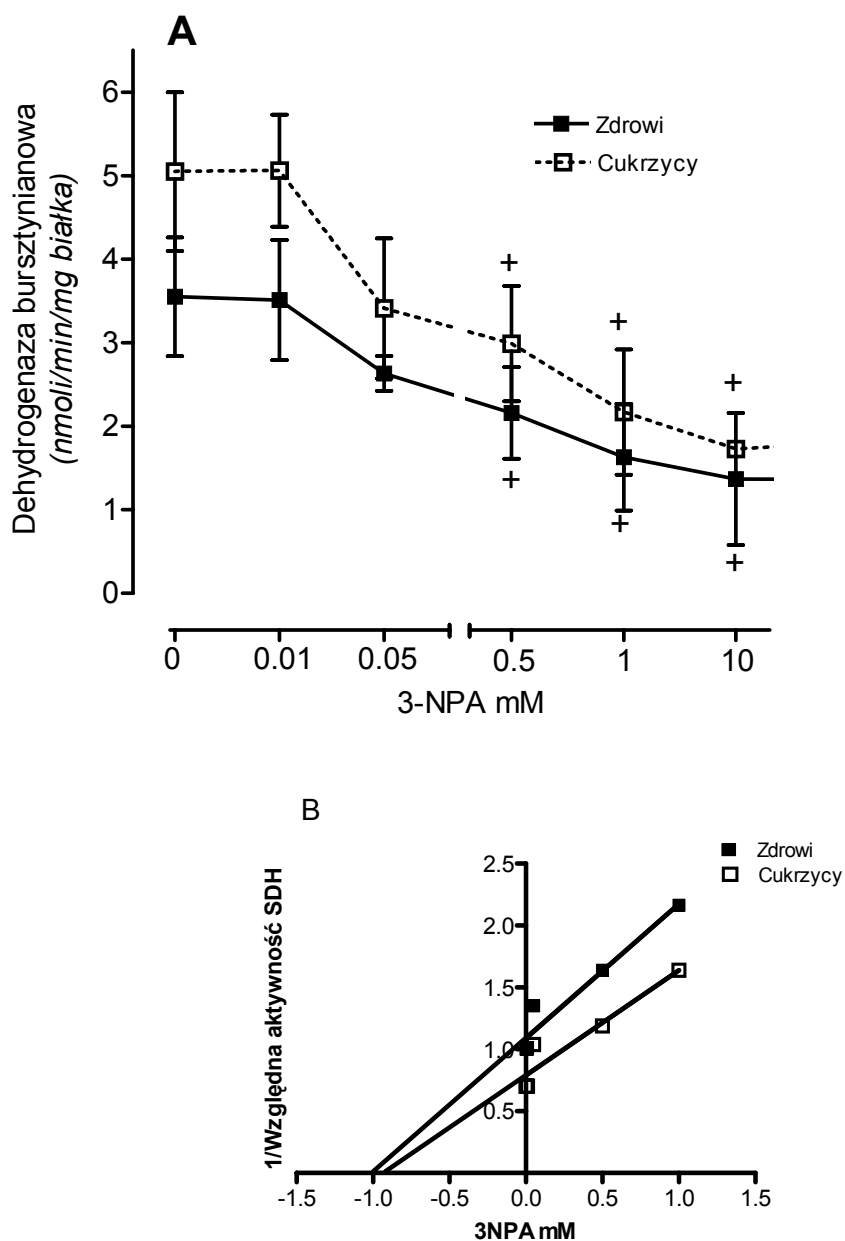
Ryc. 22. Wpływ 3-BrPG na akumulację TBARS w aktywowanych i nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7-11 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny; 3-BrPG 0.1 mM. Za 100% przyjęto szybkość akumulacji TBARS w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych równą  $0.63 \pm 0.04$  nmoli/10min/mg białka. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.05$ ; od warunków bez inhibitora + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.005$ .

#### 5.10. Wpływ 3-nitropropionianu (3-NPA) na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych

##### 5.10.1. Wpływ stężenia 3-NPA na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) w krwinkach płytkowych osób zdrowych wynosiła 3.55 nmola/min/mg białka. Cukrzyca nie powodowała istotnego wzrostu aktywności tego enzymu (Ryc. 23 A). W obu grupach doświadczalnych, 3-NPA powodował podobną, zależną od stężenia inhibicję aktywności tego enzymu. Inhibicja wynosiła około 35 %, a przy 10 mM wzrastała do około 64 % (Ryc. 23 A).



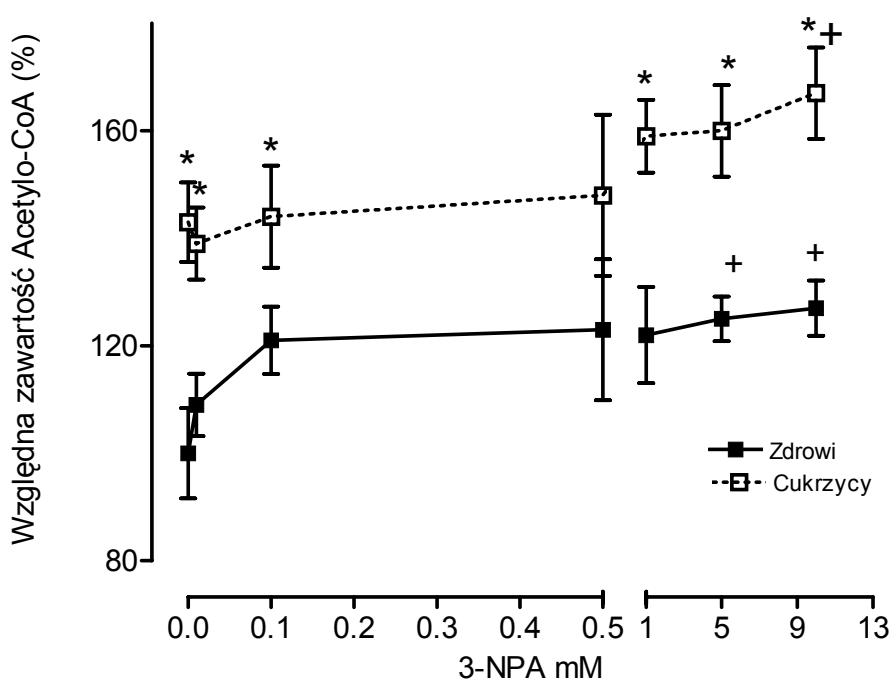
Ryc. 23. Wpływ wzrastających stężeń 3-NPA na aktywność SDH w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą (A). Wykres Dixona inhibicji SDH przez 3-NPA (B).

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 5-7 badań wykonanych podwójnie. Znamienne różne od warunków bez inhibitora:  $^+p < 0.05$ .

Stała inhibitorowa dla 3-NPA wynosiła około 1.0 mM, zarówno dla enzymu pochodzącego z płytek osób zdrowych, jak i z cukrzycą (Ryc. 23 B).

### 5.10.2. Wpływ 3-NPA na poziom acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

W warunkach kontrolnych poziom acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą był wyższy niż w płytkach osób zdrowych. 3-NPA w stężeniach do 0.5 mM nie powodował istotnych zmian poziomu acetylo-CoA ani w krwinkach płytkowych osób zdrowych ani z cukrzycą (Ryc. 24). Zwiększenie stężenia 3-NPA do 10mM powodowało wzrost poziomu acetylo-CoA w płytkach osób zdrowych o 27%, a w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą o 24% (Ryc. 24).

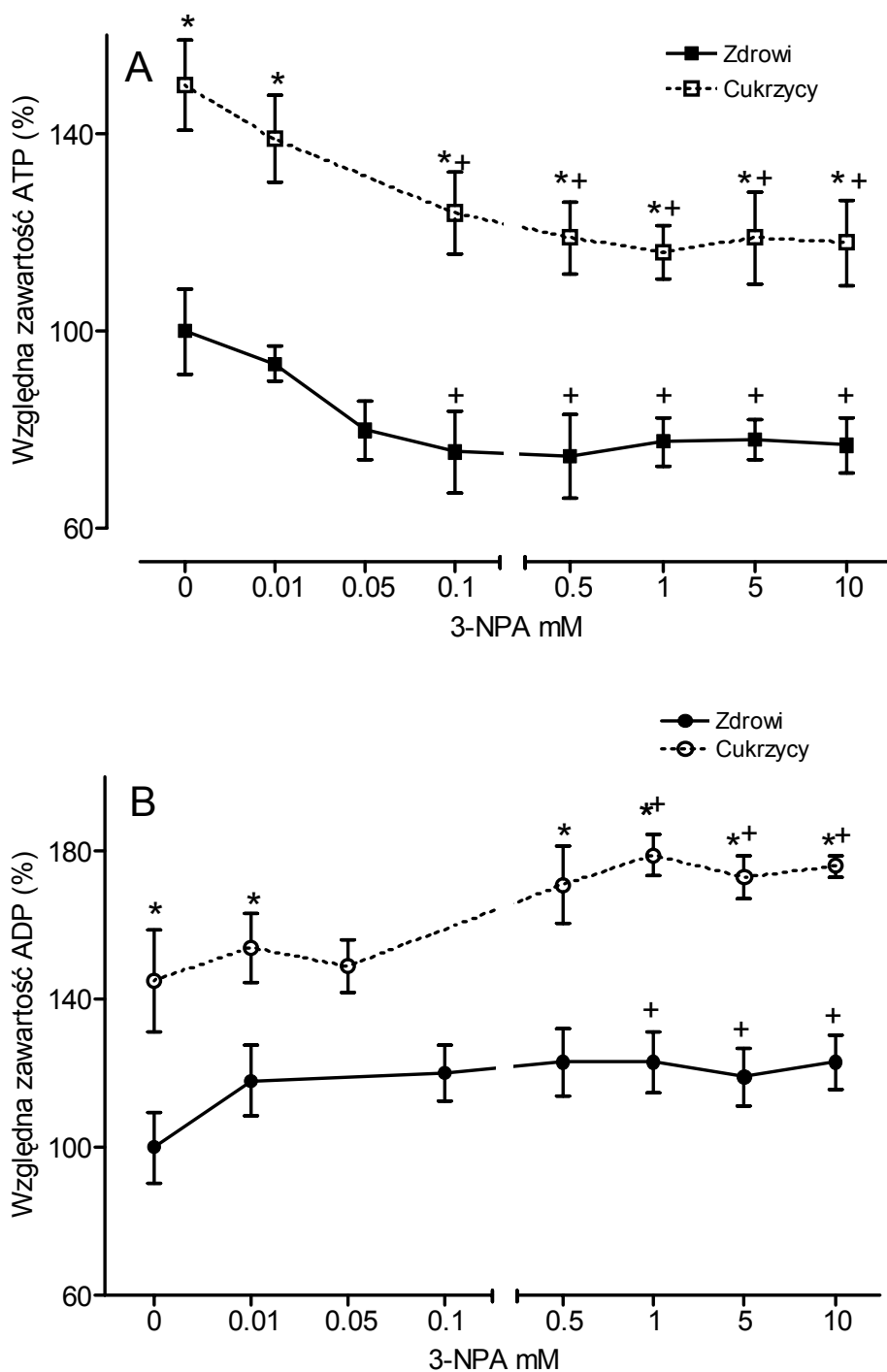


Ryc. 24. Wpływ wzrastających stężeń 3-NPA na poziom acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 5-7 badań wykonanych podwójnie. Wartość 100% odpowiada poziomowi całkowitego acetylo-CoA w płytkach osób zdrowych równemu  $15.4 \pm 3.5$  nmoli/mg białka. Znamienne różne od: osób zdrowych \*  $p < 0.005$ ; od warunków bez inhibitora +  $p < 0.05$ .

### 5.10.3. Wpływ stężenia 3-NPA na zawartość ATP i ADP w krwinkach płytkowych

Poziom ATP i ADP w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą był o około 40% wyższy niż w płytkach osób zdrowych. Wzrost stężenia 3-NPA do 0.5 mM powodował spadek zawartości ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych



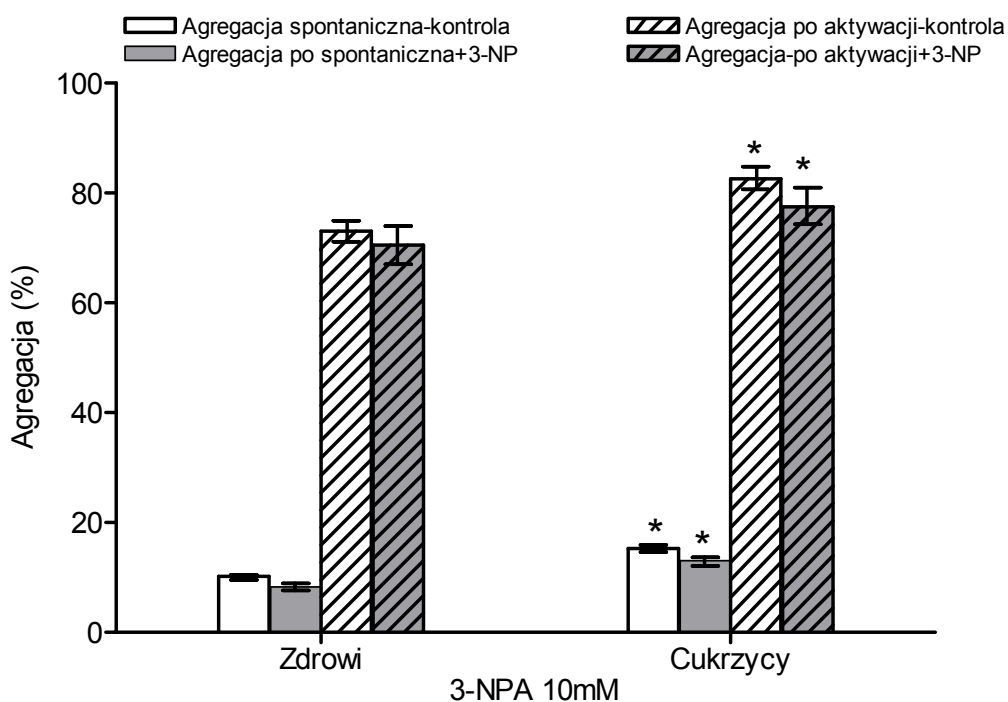
Ryc. 25. Wpływ wzrastających stężeń 3-NPA na poziom ATP (A) i ADP (B) w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 5-7 badań wykonanych podwójnie. Wartość 100% odpowiada poziomowi ATP  $26.8 \pm 1.2$  i ADP  $15.4 \pm 1.8$  nmoli/mg białka w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. Znamienne różne od: osób zdrowych \*  $p < 0.005$ ; od warunków bez inhibitora  $^+ p < 0.05$ .

i z cukrzycą odpowiednio o 25% i 31% (Ryc. 25 A). Wzrost stężenia 3-NPA do 10mM nie powodował dalszego obniżenia poziomu ATP w obu badanych grupach. Jednocześnie ze spadkiem poziomu ATP, 3-NPA powodował wzrost poziomu ADP w płytkach obu grup (Ryc. 25 A i B). I tak przy 1mM stężeniu 3-NPA poziom ADP w płytkach osób zdrowych i z cukrzycą wzrastał odpowiednio o 23% i 26% (Ryc. 25 B). Zwiększenie stężenia 3-NPA do 10mM nie powodowało dalszego wzrostu stężenia ADP w płytkach krwi (Ryc. 25 B). Na podstawie uzyskanych wyników w badaniach agregacji i akumulacji TBARS użyto 10mM stężenia 3-NPA.

#### 5.10.4. Wpływ 3-NPA na funkcję krwinek płytkowych

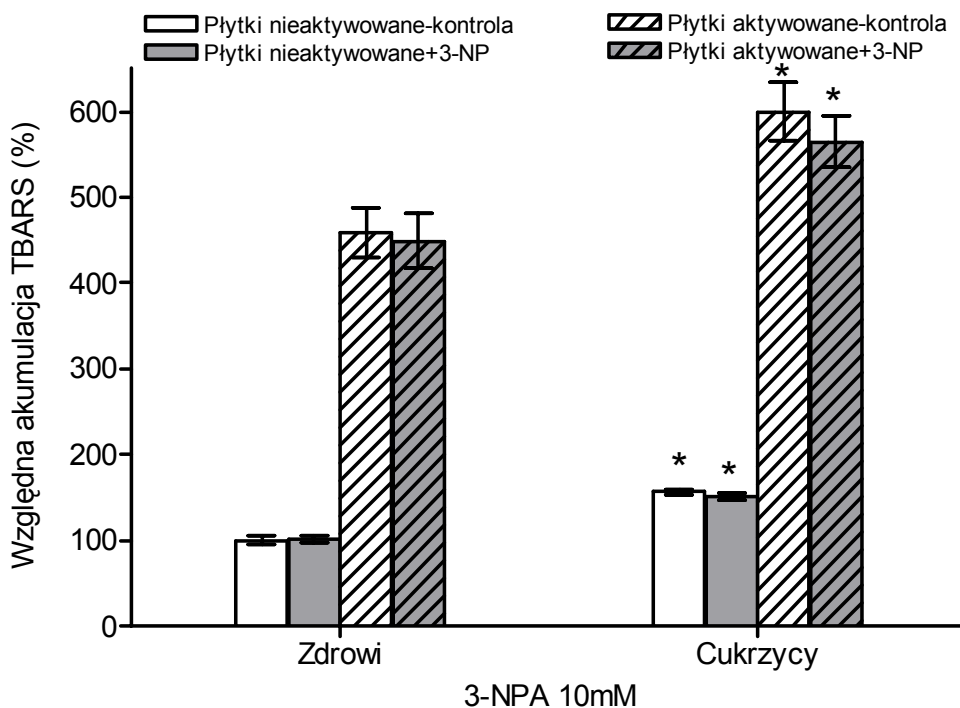
Nitropropionian w stężeniu 10 mM nie wpływał na agregację krwinek płytkowych oraz akumulację TBARS obu grupach doświadczalnych zarówno w warunkach spoczynkowych jak i po aktywacji trombiną (Ryc. 26 i 27).



Ryc. 26. Wpływ 10mM 3-NPA na spoczynkową i indukowaną trombiną agregację krwinek płytkowych.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny; 3-NPA 10 mM. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.05$ .





Ryc. 27. Wpływ 10mM 3-NPA na spoczynkową i indukowaną trombiną akumulację TBARS w krwinkach płytkowych.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 7 badań wykonanych podwójnie. Za 100% przyjęto szybkość akumulacji TBARS w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych równą  $0.49 \pm 0.02$  nmoli/10min/mg białka. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny; 3-NPA 10mM. Znamienne różne od: osób zdrowych \* $p < 0.05$ .

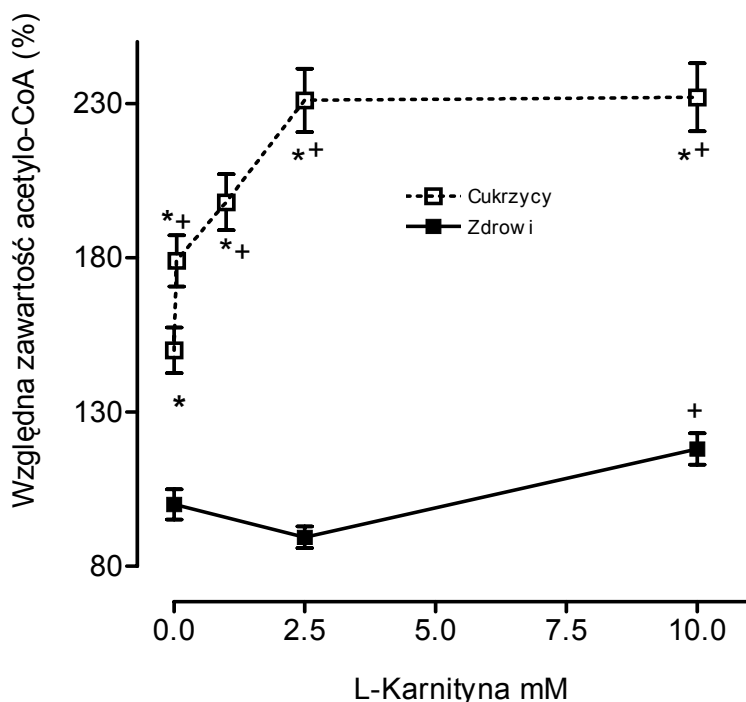
### 5.11. Wpływ L-karnityny na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych

Widomo, że pochodne L-karnityny zwiększają zawartość i szybkość syntezy acetylo-CoA oraz aktywność neuroprzebieżnikową w neuronach cholinergicznym mózgu (Szutowicz i wsp. 2005). Z drugiej strony wykazano, że estry L-karnityny mogą zmniejszać nadmierną aktywność płytek krwi chorych na cukrzycę (Pignatelli i wsp. 2003). Dlatego w tej pracy zweryfikowano hipotezę, czy w krwinkach płytkowych L-karnityna poprzez zmianę poziomu acetylo-CoA może modyfikować ich parametry metaboliczne i czynnościowe.

#### 5.11.1. Wpływ stężenia L-karnityny na poziom acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

W nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą stężenia L-karnityny wzrastające do 2.5mM powodowały stopniowy wzrost poziomu acetylo-CoA do wartości o 81% wyższej niż w warunkach kontrolnych. Dalszy wzrost stężenia L-karnityny do 10mM nie powodował zmian poziomu acetylo-CoA (Ryc. 28). U osób

zdrowych 2.5mM L-karnityna nie wpływała, a 10mM powodowała nieznaczny, 20% wzrost poziomu acetylo-CoA (Ryc. 28). Tak więc w obecności 2.5 mM L-karnityny krwinki płytkowe osób z cukrzycą zawierały prawie trzy razy więcej acetylo-CoA niż płytki osób zdrowych (Ryc. 28). Dlatego w dalszych doświadczeniach używano 2.5mM L-karnityny.

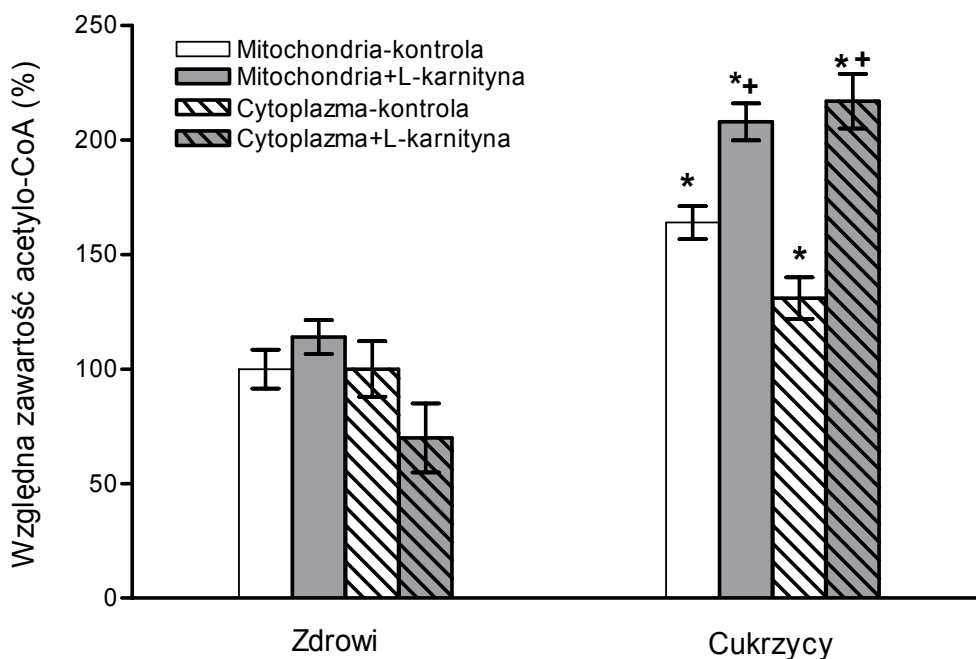


Ryc. 28. Zależny od stężenia wpływ L-karnityny na poziom acetylo-CoA w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 4-5 badań wykonanych podwójnie. Wartość 100% odpowiada poziomowi całkowitego acetylo-CoA całkowitego  $16.1 \pm 0.9$  pmoli/mg białka w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. Znamienne różnie od: osób zdrowych \* $p < 0.01$ ; od warunków bez L-karnityny  $^+ p < 0.01$ .

#### 5.11.2. Wpływ L-karnityny na wewnątrzkomórkową dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

W krwinkach płytkowych osób zdrowych 2.5 mM L-karnityna nie wpływała na zawartość mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA (Ryc. 29). Natomiast w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą 2.5 mM L-karnityna powodowała odpowiednio 27% i 97% wzrost poziomu mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA (Ryc.29). W efekcie w obecności L-karnityny poziomy mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą były odpowiednio o 94% i 147% wyższe niż w płytkach osób zdrowych (Ryc. 29).



Ryc. 29 Wpływ L-karnityny na wewnątrzpłytkową dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 14 badań wykonanych podwójnie. Wartość 100% odpowiada poziomowi acetylo-CoA: mitochondrialnego  $8.3 \pm 0.7$  i cytoplazmatycznego  $6.6 \pm 0.7$  pmoli/mg białka w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. Środowisko zawierało 2.5mM glukozę, 2.5mM L-karnitynę. Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \* $p < 0.001$ ; od warunków kontrolnych <sup>+</sup> $p < 0.001$ .

### 5.11.3. Wpływ L-karnityny na zawartość ATP i ADP w krwinkach płytkowych

L-karnityna w stężeniu 2.5mM nie zmieniała zawartości ATP i ADP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą, zarówno w warunkach spoczynkowych, jak i po aktywacji trombiną (Tabela 15).

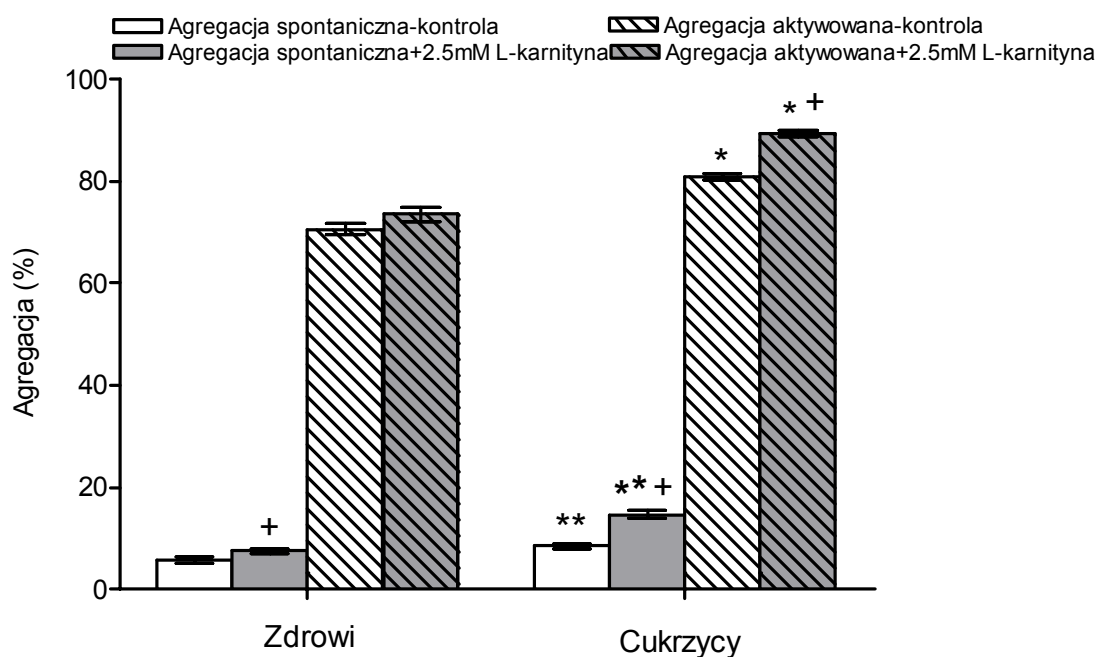
Tabela 15. Wpływ L-karnityny na zawartość ATP i ADP w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Warunki Nukleotydy	Zdrowi	Cukrzycy
	Względna zawartość (%)	
<i>Płytki nieaktywowane</i>		
ATP		
Kontrola	100±5	173±8*
2.5mM L-karnityna	95±7	156±13*
ADP		
Kontrola	100±12	162±9*
2.5mM L-karnityna	101±8	160±12*
<i>Płytki aktywowane</i>		
ATP		
Kontrola	61±9 <sup>+</sup>	67±7 <sup>+</sup>
2.5mM L-karnityna	54±5 <sup>+</sup>	66±6 <sup>+</sup>
ADP		
Kontrola	66±7 <sup>+</sup>	77±9 <sup>+</sup>
2.5mM L-karnityna	67±13 <sup>+</sup>	75±11 <sup>+</sup>

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 5 doświadczeń wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny i w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49). Wartość 100% odpowiada poziomowi ATP 26.8±2.3 i ADP 15.4±3.5 nmoli/mg białka w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych. Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.001; od wartości bez aktywacji <sup>+</sup>p< 0.01.

#### 5.11.4. Wpływ L-karnityny na funkcję krwinek płytkowych

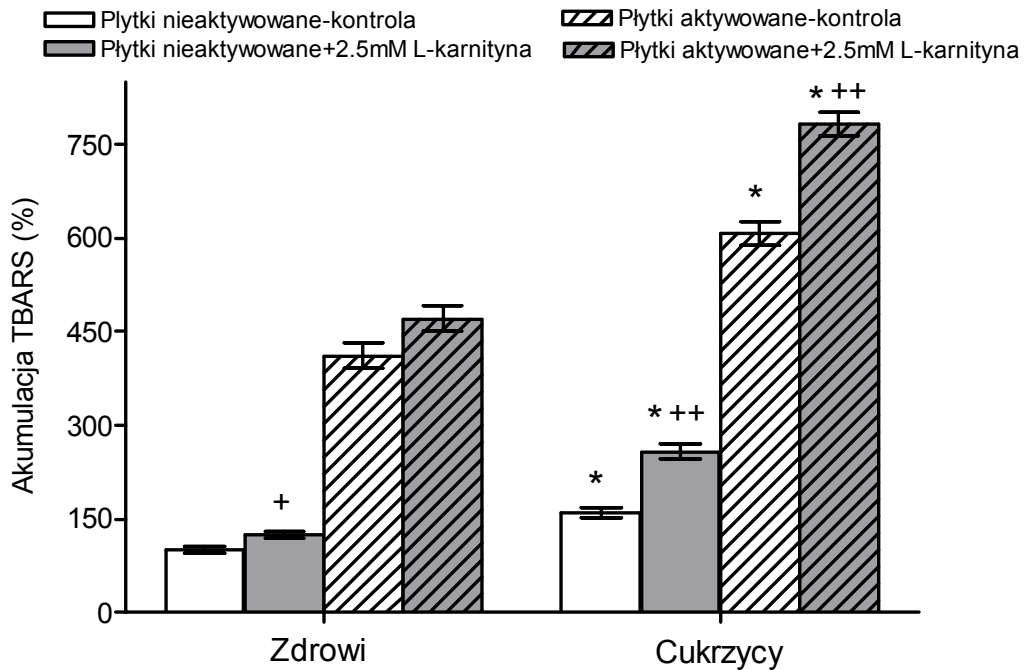
W krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą 2.5mM L-karnityna powodowała trzykrotnie wyższy wzrost agregacji spontanicznej niż w płytkach osób zdrowych (Ryc. 30). 2.5mM L-karnityna zwiększała również o 10% agregację płytek osób z cukrzycą po aktywacji trombiną (Ryc. 30). L-karnityna nie wpływała na agregację aktywowanych płytek osób zdrowych.



Ryc. 30. Wpływ 2.5mM L-karnityny na agregację spontaniczną i aktywowaną trombiną krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 14 badań wykonanych podwójnie. Środowisko zawierało 2.5mM glukozę, aktywacja 0.1JM/ml trombiny. Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ; od warunków kontrolnych <sup>+</sup> $p < 0.001$ .

Również aktywacja akumulacji TBARS przez L-karnitynę w nieaktywowanych i aktywowanych krwinkach płytkowych osób z cukrzycą była 4-5 wyższa niż w krwinkach płytkowych osób zdrowych (Ryc. 31).



Ryc. 31. Wpływ 2.5mM L-karnityny i na akumulację TBARS w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 12 badań wykonanych podwójnie. Za 100% przyjęto akumulację TBARS w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych równą  $0.51 \pm 0.03$  nmola/10min/mg białka. Środowisko zawierało 2.5mM glukozę; aktywacja 0.1JM/ml trombiny. Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \* $p < 0.05$ ; od warunków kontrolnych + $p < 0.001$ , ++ $p < 0.001$ .

#### 5.11.5. Wpływ L-karnityny na inhibycyjny wpływ 3-BrPG na parametry metaboliczne i funkcję krwinek płytkowych.

L-karnityna nie odwracała inhibycyjnego wpływu 3-BrPG na poziom acetylo-CoA, ATP/ADP i funkcję krwinek płytkowych zarówno w grupie osób zdrowych jak i z cukrzycą (Tabela 16).

Tabela 16. Wpływ L-karnityny i 3-BrPG na parametry metaboliczne i funkcję krwinek płytkowych.

Parametr/Warunki	Zdrowi	Cukrzycy
	Wartość względna (%)	
<b>Acetylo-CoA</b>		
<i>Płytki nieaktywowane</i>		
0.1mM 3-BrPG	100±3	121±5*
0.1mM 3-BrPG+2.5mM L-karnityna	98.2±7.1	122±7
<i>Płytki aktywowane</i>		
0.1mM 3-BrPG	54.0±8	68.7±7
0.1mM 3-BrPG+2.5mM L-karnityna	69.2±8	81.1±8
<b>ATP (%)</b>		
<i>Płytki nieaktywowane</i>		
0.1mM 3-BrPG	100±10	118±14
0.1mM 3-BrPG+2.5mM L-karnityna	106±8	123±10
<i>Płytki aktywowane</i>		
0.1mM 3-BrPG	27.3±3.3	31.9±3.9
0.1mM 3-BrPG+2.5mM L-karnityna	32.8±3.94	37.0±4.5
<b>Agregacja (%)</b>		
<i>Płytki nieaktywowane</i>		
0.1mM 3-BrPG	6.8±0.8	8.6±0.8
0.1mM 3-BrPG+2.5mM L-karnityna	7.8±1.2	10.1±1.1
<i>Płytki aktywowane</i>		
0.1mM 3-BrPG	52.6±1.4	50.9±2.7
0.1mM 3-BrPG+2.5mM L-karnityna	55.6±2.2	56.0±2.8

Wyniki są wartościami średnimi±standardowy błąd średniej z 6 badań wykonanych podwójnie. Za 100% przyjęto poziom całkowitego acetylo-CoA w nieaktywowanych płytkach krwi osób zdrowych po zastosowaniu 0.1mM 3-BrPG 8.2±0.4 pmoli/mg białka, poziom ATP w nieaktywowanych płytkach krwi osób zdrowych po zastosowaniu 3-BrPG 16.1±3 nmoli/mg białka. Środowisko zawierało 2.5mM glukozę; aktywacja 0.1JM/ml trombiny w obecności 2.5mM GPRP (patrz str. 49). Znamiennie różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.05.

## 5.12. Wpływ SB-204990 i (-)Hydroksycytrynianu na metabolizm i funkcję krwinek płytkowych

### 5.12.1. Wpływ SB-204990 i (-)Hydroksycytrynianu na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą

Liaza ATP-cytrynianowa jest enzymem cytoplazmatycznym odtwarzającym acetylo-CoA z cytrynianu, transportowanego przez błonę mitochondrialną do cytoplazmy (Pearce i wsp. 1998, Szutowicz i wsp. 1970, 1981). SB-204990 powoduje nieodwracalną, a (-)HC odwracalną inhibicję liazy ATP-cytrynianowej (Pearce i wsp. 1998). Dlatego więc zbadanie wpływu (-)HC i SB 204990 na agregację i akumulację TBARS w płytkach krwi pomogłoby wyjaśnić znaczenie tej drogi syntezy cytoplazmatycznego acetylo-CoA dla regulacji aktywności krwinek płytkowych.

Tabela. 17. Wpływ SB-204990 i (-)HC na aktywność liazy ATP-cytrynianowej w krwinkach płytkowych u osób zdrowych i z cukrzycą.

Warunki inkubacji	Zdrowi	Cukrzycy
	Aktywność liazy ATP- cytrynianowej (nmoli/min/ mg białka)	
bez inhibitora	2.98±0.27	4.51±0.0.30*
+ SB-204990 0.1mM	1.90±0.21 <sup>+</sup>	1.84±0.21 <sup>+</sup>
(-)HC 1.0mM	0* <sup>+</sup>	0* <sup>+</sup>

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią ± standardowy błąd średniej z 10-12 badań wykonanych podwójnie. W nawiasach podano zakresy otrzymanych wartości. Znamienne różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.05; znamienne różne od warunków bez inhibitora <sup>+</sup>p<0.001.

Aktywność specyficzna liazy ATP-cytrynianowej w krwinkach płytkowych osób zdrowych wynosiła 2.98 nmoli/min/mg białka (Tabela 17). W homogenatach nieaktywowanych krwinek płytkowych osób z cukrzycą aktywność tego enzymu była o 51% wyższa niż u osob zdrowych (p<0.05) (Tabela 17). SB-204990 obniżał aktywność liazy ATP-cytrynianowej, zarówno w krwinkach płytkowych osób cukrzycowych jak



i zdrowych, odpowiednio o 59% i 36%. (Tabela 17). W efekcie aktywności enzymu w obecności tego inhibitora w cukrzycowych i kontrolnych krwinkach płytkowych były podobne (Tabela 18). (-) HC powodował całkowite zahamowanie aktywności liazy ATP-cytrynianowej w płytkach obu grup.

#### 5.12.2. Wpływ SB-204990 i (-) HC na aktywność krwinek płytkowych

Ani SB-204990, ani (-)HC nie wpływały na akumulację TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i u pacjentów z cukrzycą (Tabela 18). Związki te powodowały 30-40% inhibicję akumulacji TBARS po aktywacji trombiną. (-)HC obniżał akumulację TBARS w płytkach osób z cukrzycą, a nie wpływał na ich akumulację w płytkach osób zdrowych (Tabela 18).

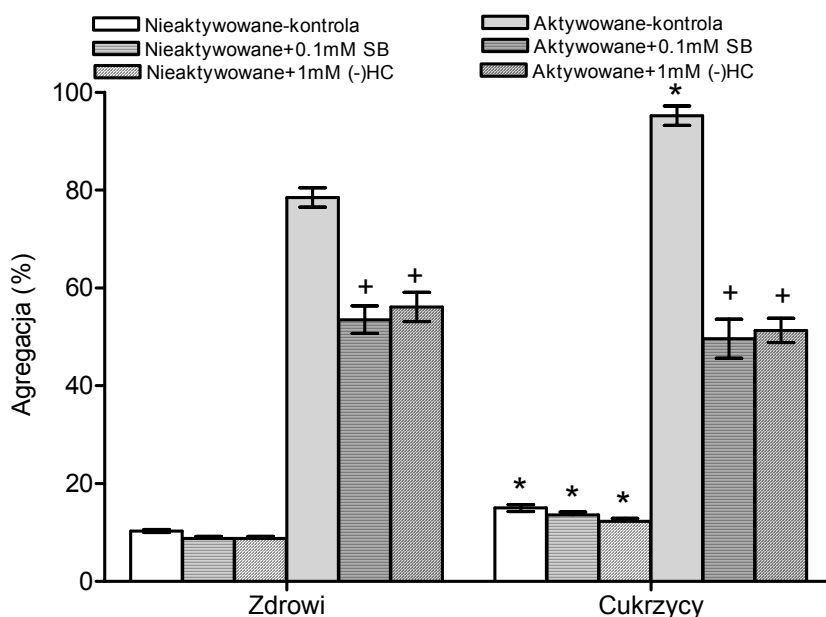
Tabela 18. Wpływ SB i (-)HC na akumulację TBARS w nieaktywowanych i aktywowanych krwinkach płytkowych.

Warunki	Zdrowi	Cukrzycy
	Akumulacja względna (%)	
<i>Płytki nieaktywowane</i>		
Kontrola	100±11.3	163±17.8*
SB-204990 0.1mM	88.7±8.1	132±9.7 <sup>+</sup>
(-)HC 1mM	93.5±4.8	119±4.8 <sup>+</sup>
<i>Płytki aktywowane</i>		
Kontrola	451±35	613±31*
SB-204990 0.1mM	210±29 <sup>++</sup>	253±31 <sup>++</sup>
(-)HC 1mM	403±24	453±40 <sup>+</sup>

Wyniki są wartościami średnimi ± standardowy błąd średniej z 11-18 badań wykonanych podwójnie. Za 100% przyjęto szybkość akumulacji TBARS w nieaktywowanych płytkach osób zdrowych równą 0.62±0.07 nmoli/10min/mg białka. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny. Znamienne różnie od: krwinek płytkowych osób zdrowych \*p<0.01; od warunków kontrolnych <sup>+</sup>p<0.01, <sup>++</sup>p<0.001.

Natomiast SB-204990 w aktywowanych płytkach krwi osób z cukrzycą powodował niemal 2 razy większą inhibicję akumulacji TBARS niż w płytkach krwi osób zdrowych (Tabela 18).

Zarówno SB-204990 jak i (-)HC nie hamowały agregacji spoczynkowej w płytkach obu grup (Ryc. 32). Natomiast w aktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą oba inhibitory powodowały odpowiednio 30 i 47% zahamowanie agregacji (Ryc. 32).



Ryc. 32. Wpływ SB-204990 i (-)HC na agregację spontaniczną i aktywowaną trombiną w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą.

Wyniki są wartościami średnimi  $\pm$  standardowy błąd średniej z 12-24 badań wykonanych podwójnie. Aktywacja 0.1JM/ml trombiny. Znamiennie różne od: krwinek płytkowych osób zdrowych \* $p < 0.001$ ; od warunków kontrolnych <sup>+</sup> $p < 0.001$ .

Przedstawione wyniki wykazały, że cukrzyca powoduje zmiany w metabolizmie reszt acetylowych i metabolizmie energetycznym krwinek płytkowych. Zmiany te mogą być przyczyną nadmiernej aktywności płytek krwi u pacjentów z cukrzycą. Stopień zaburzeń metabolizmu i czynności w płytkach krwi może zależeć od stopnia kontroli glikemii w tej chorobie.

## 6. DYSKUSJA

### 6.1. Charakterystyka grup doświadczalnych

Pacjenci z cukrzycą typu 2 byli starsi od pacjentów z cukrzycą typu 1 średnio o 16 lat. Wiadomo również, że mechanizm cukrzycy typu 2 jest inny niż typu 1. Średni czas trwania choroby w grupie pacjentów z cukrzycą typu 1 był o 14 lat dłuższy niż w grupie 2 (Tabela 1). Wynika to z faktu ujawniania się cukrzycy typu 1 w wieku kilkunastu lat, a cukrzycy typu 2 powyżej 40 lat. Uzasadniało to również wstępny podział osób z cukrzycą na dwie podgrupy doświadczalne i oddzielną analizę statystyczną uzyskiwanych wyników badań (Tabela 1, 2, 3, 5, 8, 9, Ryc. 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12). Okazało się jednak, że parametry kontroli glikemii, metabolizmu acetylo-CoA, metabolizmu energetycznego i funkcji krwinek płytkowych w obu grupach chorych na cukrzycę miały takie same wartości średnie i dystrybucję wyników. Pozwoliło to na przeprowadzenie analizy współzależności (korelacji) między parametrami kontroli glikemii, metabolizmu i funkcji płytek krwi w ramach jednej połączonej grupy osób z cukrzycą (Tabela 6, 7, 10, 11-18 Ryc. 4, 8, 11, 13-32). Również badania wpływu inhibitorów/aktywatorów na metabolizm acetylo-CoA i poziom ATP można było analizować łącznie w płytkach krwi od pacjentów z obu typami cukrzycy (Tabela 14-19, Ryc. 13-32).

Zaburzenia krzepnięcia krwi w cukrzycy są wypadkową zmian patologicznych w płytkach krwi, osoczowych czynnikach krzepnięcia i fibrynolizy, śródbłonku naczyniowym jak również w krwinkach białych i czerwonych. Istotnym czynnikiem są tu zmiany we wzajemnym oddziaływaniu wyżej wymienionych elementów układu krzepnięcia i fibrynolizy spowodowane nadmierną glikacją białek (Winocour, 1992, Vericel i wsp. 2004). Dlatego w naszych doświadczeniach posługiwaliśmy się izolowanymi krwinkami płytkowymi w celu wykluczenia oddziaływania osocza krwi i innych elementów morfotycznych na ich funkcję i metabolizm (Heptinstall i wsp. 2005). Stąd opisane przez nas zaburzenia metabolizmu i funkcji płytek krwi w cukrzycy można przypisać zmianom zachodzącym w samych płytkach krwi podczas ich ekspresji na hiperglikemię.

Hiperglikemia na czczo, której średnie stężenie wynosiło 167 mg/dl nie może być wykładnikiem średniego poziomu glikemii w dłuższym okresie czasu. Tłumaczy to brak korelacji między poziomem glikemii na czczo i parametrami funkcji płytek w cukrzycy (Skibowska i wsp. 2000, 2003). Zalecane stężenie HbA<sub>1c</sub> we krwi prawidłowo

leczonych pacjentów z cukrzycą powinno wynosić poniżej 6.5% (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, 2006). W naszych badaniach wykazaliśmy, że 87% pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 wykazywało wartości wyższe niż pożądane dla tego parametru (Ryc. 2 A). Jednocześnie u 86% pacjentów z cukrzycą typu 1 i u 92% z cukrzycą typu 2 stężenie fruktozaminy w osoczu było wyższe od poziomu odcięcia dla osób zdrowych (Ryc. 2 B) (Baker i wsp. 1994). Podobne poziomy parametrów wskaźnikowych wyrównania stanu długotwalej, średniej glikemii (HbA<sub>1c</sub>, fruktozaminy) w grupach pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 mogą świadczyć o tym, że niezależnie od zastosowanego sposobu leczenia nadmierna glikacja białek krwinek płytkowych i osocza w równym stopniu dotyczyła pacjentów z obu typami cukrzycy (Tabela 1, Ryc. 2 A i B). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że w stosunku do badań prowadzonych 4-5 lat wcześniej, parametry kontroli glikemii u pacjentów z cukrzycą uległy poprawie (Skibowska i wsp. 2000, 2003). I tak: średni poziom HbA<sub>1c</sub> obniżył się z 8.9 do 8.3%, a fruktozaminy z 389 do 346 μmoli/L. Wskazuje to na poprawę skuteczności terapii cukrzycy wśród pacjentów naszej Przychodni Diabetologicznej (Tabela 1, Ryc. 2 A i B) (Skibowska i wsp. 2000, 2003). Obniżeniu uległy również poziomy cholesterolu LDL i triglicerydów u pacjentów z cukrzycą (Tabela 1) (Skibowska i wsp. 2000, 2003). Przewlekła hiperglikemia w cukrzycy może prowadzić również do nieenzymatycznej glikacji białek płytek krwi i modyfikacji struktury receptorów powierzchniowych oraz ich metabolizmu (Hasegawa i wsp. 2002, Skibowska i wsp. 2003, Watała i wsp. 1996, Winocour, 1992). W grupie przebadanych pacjentów z cukrzycą obu typów poziomy HbA<sub>1c</sub> i fruktozaminy były wyższe niż w populacji osób zdrowych (Tabela 1, Ryc. 2). Świadczy to o tym, że zarówno megakariocyty jak i krwinki płytkowe były ekspozowane na wyższy poziom glukozy w czasie około 10-14 dniowego czasu przeżycia tych ostatnich w krwioobiegu (Tabela 1, Ryc. 2 A i B). Mogło to istotnie modyfikować zarówno ich metabolizm, jak i funkcję płytek krwi (Tabela 5, 6, 7, 8, 9, Ryc. 5, 6, 9, 10).

U pacjentów z cukrzycą typu 1 poziomy cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL były nieznacznie wyższe od niskich wartości pożądanych dla osób z cukrzycą. Nie różniły się jednak statystycznie od wartości oczekiwanej dla osób zdrowych w podobnym przedziale wiekowym (Tabela 1) (Polskie Towarzystwo Diabetologiczne, 2006). Z drugiej strony u osób z cukrzycą typu 2 poziomy cholesterolu całkowitego oraz LDL były wyższe od wartości pożądanych, ale nie różniły się od wartości w odpowiednio dobranej grupie wiekowej osób zdrowych (Tabela 1). Wskazuje to, że

przy stosowanym leczeniu, wiek a nie hiperglikemia był istotnym czynnikiem powodującym hipercholesterolemię w cukrzycy typu 2 (Tabela 1) (Pesce i Kaplan, 1987). U pacjentów z cukrzycą typu 1 stężenie triglicerydów było nieznacznie wyższe niż w odpowiedniej grupie osób zdrowych, ale mieściło się w granicach wartości zalecanych dla ogólnej populacji. Z drugiej strony, u pacjentów z cukrzycą typu 2 średnie stężenie triglicerydów było wyższe od wartości pożądanej (<150mg/dl) i wyższe niż u osób zdrowych w tym samym przedziale wiekowym (Tabela 1,  $p < 0.001$ ) oraz u pacjentów z cukrzycą typu 1 (Tabela 1,  $p < 0.001$ ). Ta różnica między obu typami cukrzycy może wynikać z faktu, że u osób z cukrzycą typu 1 egzogenna insulina stymuluje wychwyt triglicerydów z łożyska naczyniowego i zwiększa ich metabolizm w tkance tłuszczowej (Eckel i wsp. 1989). Natomiast u pacjentów z cukrzycą typu 2 przy istniejącej insulinooporności, wysoki poziom insuliny nie wystarczał do stymulacji wychwytu glukozy i triglicerydów przez tkanki, był natomiast wystarczający do stymulacji lipogenezy w wątrobie (Tabela 1) (Utzschneider i wsp. 2006).

Nieobecność różnic w liczbie krwinek płytkowych we krwi między pacjentami z cukrzycą typu 1 i 2, a osobami zdrowymi 1 i 2 grupy świadczy o tym, że cukrzyca nie upośledza procesu wytwarzania płytek krwi. Nie wyklucza to ewentualnego udziału zmian struktury i metabolizmu krwinek płytkowych w ich nadmiernej reaktywności w cukrzycy (Tabela 2) (Skibowska i wsp. 2003, Vericel i wsp. 2004).

Jednocześnie uważa się, że w cukrzycy dochodzi do zwiększonego wyrzutu młodszych krwinek płytkowych o zwiększonej objętości i reaktywności (Watała i wsp. 1991). Co więcej inni badacze wykazali zależność pomiędzy wzrostem MPV, a wystąpieniem powikłań o charakterze mikroangiopatii (Papanas i wsp. 2004). Nasze badania nie potwierdziły tych obserwacji, gdyż średnia objętość krwinek płytkowych (MPV) była podobna we wszystkich analizowanych grupach (Tabela 2). Nieobecność różnic w MPV w badanych grupach można tłumaczyć wykluczeniem z naszych badań pacjentów z jawną mikro i makroangiopatią (Tabela 2). Z drugiej strony inni autorzy sugerują, że zwiększona reaktywność płytek w cukrzycy może wynikać ze zmian nie związanych z ich objętością. Jako przyczyny wymienia się wzrost oporności płytek krwi na insulinę, zwiększoną aktywację receptorów purynowych czy też obecność mikrocząstek płytkowych (Ferreira i wsp. 2006, Tan i wsp. 2005). Podkreśla się również rolę leukocytów i erytrocytów w aktywacji krwinek płytkowych, które poprzez ekto-ATP-azy mogą zwiększać poziom zewnątrzkomórkowego ADP (Heptinstall i wsp. 2005). Jednakże fakt, że stopień zanieczyszczenia uzyskanych przez nas preparatów

izolowanych krwinek płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą przez leukocyty był mniejszy niż 0.1 %, a przez erytrocyty mniejszy niż 3.2% wyklucza udział tych ekto-ATP-az w powstawaniu różnic aktywności płytek krwi między tymi grupami doświadczalnymi (Tabela 3) (Heptinstall i wsp. 2005). Nasze badania wskazują natomiast na istotną rolę akumulacji endogenego ATP/ADP w powstawaniu nadmiernej aktywacji płytek w cukrzycy (Ryc. 6, 7, 8).

#### 6.1.1. Weryfikacja metody izolacji płytek krwi i mitochondriów płytkowych.

Zastosowana w pracy procedura izolacji płytek z krwi pobranej na EDTA różniła się od powszechnie stosowanej metody izolacji płytek z krwi cytrynianowej (Materiały i metody, patrz str. 43). Metodę taką zastosowano w celu wykluczenia interferencji cytrynianu z oznaczaniem acetylo-CoA metodą cyklizacyjną (Skibowska i wsp. 2003, Szutowicz i Bielarczyk, 1987). Fakt, że odzysk płytek krwi wynosił około 62% wynikał z procedury jednorazowego przemywania krwi względnie małą objętością roztworu płuczącego (Tabela 3) (Materiały i metody, patrz str. 43). Jednakże objętość izolowanych płytek równa objętości płytek we krwi pełnej wskazuje, że stosowana nietypowa procedura izolacji pozwalała na izolację reprezentatywnej populacji płytek (Tabela 3). Można również sądzić, że EDTA i temperatura +4<sup>0</sup>C nie powodowała ich pęcznienia podczas izolacji. Jednocześnie izolowane przez nas płytki z krwi pobieranej na EDTA wykazywały taki sam poziom agregacji jak płytki izolowane z krwi pobranej na 3.2% cytrynian sodu (Pignatelli i wsp. 1995), (badania niepublikowane). Świadczy to o tym, że stosowana procedura nie upośledzała funkcji płytek. Takie stwierdzenie pozostaje również w zgodzie z faktem, że wartości agregacji spoczynkowej i stymulowanej trombiną były porównywalne z wynikami uzyskiwanymi na płytkach izolowanych z osocza cytrynianowego przez innych autorów (Haseruck i wsp. 2004, Jarvis i wsp. 2003).

Digitonina powoduje rozpuszczenie bogatych w sfingomielinę i cholesterol błon plazmatycznych, a pozostawia nietknięte błony mitochondrialne zawierające duże ilości kardiolipin i cholesterolu (Szutowicz i Bielarczyk, 1987). Fakt, że zastosowane stężenie digitoniny (1.2 mg/ml) uwolniło do nadsącza prawie 85 % aktywności dehydrogenazy mleczanowej i tylko 15% dehydrogenazy glutaminianowej wskazuje, że rozpuszczenie błon plazmatycznych nie powodowało istotnego uszkodzenia integralności błon izolowanych mitochondriów. Zastosowana procedura daje wyniki porównywalne z uzyskanymi innymi metodami (D'Argenio i wsp. 2006). Tym samym model ten mógł

być użyty do badań subkomórkowej dystrybucji acetylo-CoA w płytkach krwi (Tabela 4 i 5).

## 6.2. Wpływ cukrzycy na aktywność enzymów metabolizmu energetycznego i acetylo-CoA krwinek płytkowych.

Zwiększony poziom HbA<sub>1c</sub> we krwi i fruktozaminy w osoczu pacjentów z cukrzycą (Tabela 1, Ryc. 2 A i B) wskazuje na to, że zarówno megakariocyty w szpiku, jak i krwinki płytkowe były ekspozowane na przewlekłą hiperglikemii w trakcie ich życia w krwioobiegu. Obserwowany wzrost aktywności syntazy kwasów tłuszczowych, dehydrogenazy  $\alpha$ -ketogluutaranowej, akonitazy, liazy ATP-cytrynianowej i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej może świadczyć o adaptacyjnym wzroście poziomu białek tych enzymów lub/i ich aktywności w odpowiedzi na hiperglikemii (Tabela 6). Przepuszczalnie miało to miejsce na poziomie megakariocytów pacjentów z cukrzycą. Zwiększony napływ glukozy poprzez Glut3 mógł aktywować ekspresję genów tych enzymów w komórkach prekursorowych płytek krwi (Craig i wsp. 1995, Sorbara i wsp. 1997). Nie można też wykluczyć modyfikacji posttranslacyjnych przez wzmożoną glikację tych enzymów w dojrzałych płytkach. Wyniki te są zgodne z danymi z naszych wcześniejszych prac, w których wykazano wzrost aktywności heksokinazy, PDH i liazy ATP-cytrynianowej w płytkach osób z cukrzycą typu 1 (Tabela 6) (Skibowska i wsp. 2003). Można przypuszczać, że adaptacyjna aktywacja aktywności szeregu enzymów glikolizy i metabolizmu acetylo-CoA spowodowała wzrost poziomu acetylo-CoA w płytkach krwi (Tabela 5, 6, Ryc. 3 i 4). Zwiększenie stężenia tego metabolitu mogłoby z kolei aktywować ekspresję genów odpowiadających za zwiększenie poziomu syntezy enzymów związanych z metabolizmem glukozy i acetylo-CoA, tworząc swoisty rodzaj sprzężenia dodatniego. Hipoteza ta byłaby zgodna z obserwacjami, że stres metaboliczny wynikający także z hiperglikemii może regulować intensywność transkrypcji wielu genów poprzez zmiany poziomu acetylo-CoA w komórkach (Choi i wsp. 2005). Zgodnie z tą hipotezą inni autorzy, wykazali wyższą aktywność dehydrogenazy mleczanowej w populacji płytek cukrzycowych o małej gęstości (Zappacosta i wsp. 1995) oraz palmitoiltransferazy karnitynowej I w płytkach nieaktywowanych i aktywowanych trombiną (Iida i wsp. 1993). Z drugiej strony inne dane sugerują, że w płytkach osób z cukrzycą może dochodzić raczej do zmniejszenia napływu glukozy do ich wnętrza wskutek zmniejszenia powinowactwa

glukozy do związanej z błoną mitochondrialną heksokinazy (Leoncini i wsp. 1987). Przyczyny tych rozbieżności pozostają niewyjaśnione.

Zwiększona aktywność G-6-PDH w płytkach osób z cukrzycą może powodować wzrost syntezy NADPH, który następnie może być użyty do syntezy kwasów tłuszczowych (Tabela 6). Zwiększona aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych wydaje się być zgodna z tymi danymi (Tabela 6). Wykazany wzrost aktywności G-6-PDH może również być pośrednio związany z opisanym przez innych autorów wzrostem aktywności reduktazy glutationu w płytkach pacjentów z cukrzycą typu 2 (Tabela 6) (Di Simplicio i wsp. 1995). Jednocześnie spadek poziomu glukozo-6-fosforanu w płytkach osób z cukrzycą może świadczyć o zwiększonym jego zużyciu przez G-6-PDH a następnie w szlaku pentozomonofosforanowym (Tabela 6 i 7) (Kotelba-Witkowska, 1984). Wzrost akumulacji mleczanu w krwinkach płytkowych po zastosowaniu trombiny wskazuje, że również aktywacja glikolizy może być nienzymatycznym czynnikiem obniżającym poziom G-6-P (Tabela 7) (Kotelba-Witkowska, 1984). G-6-P jest znanym aktywatorem elementu odpowiedzi na glukozę, który aktywuje szereg promotorów genów enzymów metabolizmu acetylo-CoA i syntezy lipidów. Jednakże w przypadku krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą, aktywacja liazy ATP-cytrynianowej, syntetazy kwasów tłuszczowych, PDH była zależna od innego mechanizmu, ponieważ poziom G-6-P ulegał w nich znacznemu obniżeniu (Tabela 7). Spadek zawartości glukozo-6-fosforanu o 43% w obu badanych grupach płytek krwi po aktywacji trombiną może również świadczyć o zwiększonym jego zużyciu przez zaktywowane płytki w szlaku glikolitycznym (Tabela 7). To z kolei może ułatwiać transport glukozy do wnętrza krwinek płytkowych. Wykazano bowiem, że w aktywowanych krwinkach płytkowych dochodziło do ponad dwukrotnego wzrostu napływu glukozy do ich wnętrza oraz wzrostu aktywności fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej (Heijnen i wsp. 1997, Iida i wsp. 1993, Sorbara i wsp. 1997). Wzrost aktywności enzymów mitochondrialnych: akonitazy i dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranowej w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą może wiązać się ze zwiększonym obrotem acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych (Tabela 5 i 6). Nieobecność zmian w aktywności syntazy cytrynianowej w płytkach krwi osób z cukrzycą może wynikać z faktu, że nie podlega ona regulacji przy zmianie metabolizmu glukozy. Oprócz tego ze względu na wysoką aktywność specyficzną nie jest to enzym regulujący szybkość cyklu kwasów trójkarboksylowych w płytkach krwi (Tabela 6). Świadczy to również o selektywnej aktywacji przez przewlekłą hiperglikemię



enzymów związanych z metabolizmem energetycznym i acetylo-CoA.

### 6.3. Wpływ cukrzycy na poziom i dystrybucję acetylo-CoA w krwinkach płytkowych

Wykazany w tej pracy wzrost poziomu całkowitego i mitochondrialnego acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą typu 1 i 2 jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi cukrzycy typu 1 (Tabela 5, Ryc. 3) (Skibowska i wsp. 2003). Może być on związany z adaptacyjnymi zmianami poziomu aktywności enzymów związanych ze zużyciem glukozy w cytoplazmie i metabolizmem acetylo-CoA we frakcji mitochondrialnej, do których zaliczane są: heksokinaza i dehydrogenaza pirogronianowa (Tabela 5 i 6) (Skibowska i wsp. 2003). Stwierdzone przez nas zwiększenie poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą może wynikać ze wzrostu aktywności liazy ATP-cytrynianowej, enzymu odpowiedzialnego za pośredni transport acetylo-CoA z frakcji mitochondrialnej do cytoplazmatycznej (Tabela 5 i 6) (Szutowicz i wsp. 1981). Jednakże aktywacja tej drogi transportu w cukrzycy zależy od przyspieszenia syntezy acetylo-CoA w mitochondriach płytek. Świadczy o tym spadek poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA w płytkach osób z cukrzycą po zahamowaniu aktywności dehydrogenazy pirogronianowej przez 3-BrPG (Tabela 14). Tak więc, inhibicja PDH w płytkach cukrzycowych powodowałaby spadek mitochondrialnego acetylo-CoA do poziomu grupy kontrolnej a to z kolei dawałoby „normalizację” poziomu tego metabolitu w cytoplazmie (Tabela 14). Mechanizm względnej niewrażliwości mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA w płytkach osób zdrowych na inhibicję 3-BrPG pozostaje niewyjaśniony (Tabela 14). Po aktywacji krwinek płytkowych obserwowano spadek poziomu całkowitego, mitochondrialnego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA zarówno w płytkach osób zdrowych jak i pacjentów z cukrzycą (Tabela 5). Świadczy to o tym, że w zaktywowanych płytkach krwi dochodzi do przyspieszenia transportu acetylo-CoA z przedziału mitochondrialnego do cytoplazmatycznego, gdzie może on być zużywany do syntezy czynników aktywacji płytek takich jak tromboksan  $A_2$  (MDA/TBARS) czy też czynnik aktywujący płytki (PAF). Stwierdzony przez nas większy spadek poziomu acetylo-CoA w aktywowanych płytkach pacjentów z cukrzycą niż u osób zdrowych może wiązać się ze zwiększoną produkcją tromboksanu  $A_2$ /MDA, PAF i zwiększoną ich agregacją (Tabela 5, 8 i 9 Ryc. 9 i 10) (Collins, 2004). Obserwowana przez nas aktywacja syntetazy kwasów tłuszczowych przy zwiększonym transporcie i poziomie acetylo-CoA w cytoplazmie, w płytkach osób chorych na cukrzycę zapewniałaby

wzrost syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych (Tabela 5 i 6). Istnienie korelacji pomiędzy stężeniem fruktozaminy, a poziomem całkowitego acetylo-CoA w płytkach osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą może być pośrednim dowodem na to, że poziom glikacji białek jest zależny od średniego poziomu glikemii i modyfikuje przemianę tego metabolitu w płytkach krwi (Tabela 5, Ryc. 4 A i B). Nie jest więc wykluczone, że zależnie od średniego stężenia glukozy, zmiany szybkości jej napływu do wnętrza płytek odgrywają istotną rolę w mechanizmie prowadzącym do wzrostu poziomu acetylo-CoA w płytkach niezależnie od współistnienia innych zmian patologicznych. Obserwowana wyższa znamienność korelacji pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu pacjentów z cukrzycą, a poziomem acetylo-CoA (Ryc. 4 A i B) jest zgodna z hipotezą, że zwiększone zużycie glukozy i glikacja białek mogą powodować adaptacyjną aktywację enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w cukrzycy.

Nieobecność różnic w poziomie i dystrybucji acetylo-CoA w płytkach pomiędzy cukrzycą typu 1 i 2 może być spowodowana tym, że to nie sposób leczenia cukrzycy, a stopień przewlekłej hiperglikemii jest istotnym czynnikiem modyfikującym metabolizm reszt acetylowych w płytkach krwi w cukrzycy (Tabela 5, Ryc. 3). Jednocześnie znamienna korelacja między stężeniem fruktozaminy i poziomem acetylo-CoA w płytkach świadczy, że długoterminowe utrzymanie odpowiednio niskiego poziomu glukozy w osoczu pacjentów z cukrzycą mogłoby być istotnym czynnikiem w normalizacji metabolizmu płytek krwi, niezależnie od zastosowanej terapii i zmian poziomu lipidów (Ryc. 4, Tabela 1). Istnieją bowiem doniesienia o oporności płytek krwi osób z cukrzycą typu 2 na działanie insuliny, która hamuje aktywność płytek krwi osób zdrowych natomiast wykazuje niewielki wpływ na płytki pacjentów z cukrzycą (Ferreira i wsp. 2005, 2006).

#### 6.4. Wpływ cukrzycy na zawartość i uwalnianie ATP i ADP w krwinkach płytkowych

Wyniki oznaczeń poziomu ATP i ADP w płytkach osób zdrowych były porównywalne z danymi przedstawianymi w innych pracach (Collier i wsp. 1986, D'Souza i wsp. 1977, Gulliksson i wsp. 2002). Wskazuje to, że stosowana przez nas metoda izolacji i inkubacji krwinek płytkowych zapewnia stabilność znajdujących się w nich puli nukleotydów adenylowych, a płytki izolowane naszą metodą stanowiły odpowiedni materiał do badań nad wewnątrzpłytkową dystrybucją tych nukleotydów zarówno u ludzi zdrowych jak i chorych na cukrzycę (Ryc. 5, 6, 7).

Zwiększone zużycie glukozy i wzrost aktywności enzymów związanych z metabolizmem reszty acetylowej w mitochondriach krwinek płytkowych mogą zwiększać poziom acetylo-coA w mitochondriach, a tym samym szybkość cyklu kwasów trójkarboksylowych i syntezy ATP i ADP (Tabela 5, 6, 8 i 9, Ryc. 5, 6, 7). Istnienie znamiennej korelacji między stężeniem fruktozaminy, a poziomem ATP w nieaktywowanych płytkach krwi zarówno osób zdrowych jak i pacjentów z cukrzycą może być pośrednim dowodem na to, że istotnie, średnia wartość glikemii ma wpływ na zawartość ATP w płytkach krwi (Ryc. 8 A i B).

Z drugiej strony przedstawione dane są sprzeczne z wynikami innych badaczy, którzy nie obserwowali zmian w poziomie płytkowego ATP i ADP w grupie dzieci z cukrzycą (Collier i wsp. 1986). Różnice te mogą wynikać z faktu, że autorzy ci izolowali płytki krwi na gradiencie Percollu, w środowisku zawierającym 10mM EDTA, podczas gdy w naszych doświadczeniach stosowaliśmy standardowe wirowanie, przy 100xg w obecności 0.1 mM EDTA (patrz str. 43). Z drugiej strony nasze wyniki są zgodne z doniesieniami wykazującymi, że we wrodzonych lub nabytych niedoborach energetycznych w krwinkach płytkowych można obserwować zmniejszenie puli ATP/ADP w ziarnistościach gęstych (Ryc. 17, 20, 26 A) (Akkerman i wsp. 1984, Leoncini i Maresca, 1984).

Obserwowany spadek poziomu ATP i ADP po aktywacji płytek krwi osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą może wynikać z sekrecji obu nukleotydów z ziarnistości gęstych (Ryc. 5, 6, 19, 20). Natomiast całkowita zawartość ATP/ADP w krwinkach płytkowych wykazana w naszych doświadczeniach była sumą zarówno puli wydzielniczej (pęcherzykowej) jak i metabolicznej-mitochondrialnej i cytoplazmatycznej (Ryc. 5 i 6) (Leoncini i Maresca, 1984, Sanchez, 1985). Ilość ATP/ADP wydzielonego z krwinek płytkowych w trakcie ich aktywacji trombiną odpowiadać może wielkości puli pęcherzykowej/magazynowej (Ryc. 5, 6, 19 i 20). Natomiast frakcja nukleotydów, która pozostawała w płytkach po aktywacji odpowiadałaby sumie nukleotydów znajdujących się w przedziale mitochondrialnym i cytoplazmatycznym (Ryc. 5, 6, 19 i 20). Przedstawione dane wskazują, że zawartość ATP/ADP w puli wydzielniczej w płytkach pacjentów z cukrzycą była większa niż u osób zdrowych (Ryc. 5 i 6). Natomiast zawartość ATP/ADP w puli cytoplazmatycznej i mitochondrialnej nie była zwiększona, gdyż poziom ATP/ADP w zaktywowanych płytkach pacjentów z cukrzycą był podobny do poziomu tych nukleotydów u osób zdrowych (Ryc. 5 i 6).

Suma ATP i ADP wydzielonych z płytek krwi była równa ich sumarycznemu ubytkowi z płytek krwi. Wskazuje to na pełny odzysk wydzielonego ATP i ADP oraz, że w tych warunkach doświadczalnych nie dochodziło do ich rozpadu do AMP i adenozyiny (Ryc. 5 i 6). Może być to związane z tym, że w oczyszczonych preparatach płytek krwi nie stwierdza się enzymów degradujących ATP i ADP do AMP i adenozyiny, pochodzących z leukocytów i erytrocytów (Stafford i wsp. 2003). Aktywność enzymów płytkowych związanych z rozkładem ATP takich jak: apyraza czy cyklaza adenylanowa jest zbyt niska do istotnej degradacji ATP i ADP (Ryc. 5 i 6) (Kotelba-Witkowska, 1984, Glenn i wsp. 2005, Heptinstall i wsp. 2005). Powyższe dane są zgodne z naszą hipotezą, że zwiększona aktywność krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą może wynikać ze zwiększonej dostępności acetylo-CoA, który w cytoplazmie może być substratem do produkcji tromboksanu  $A_2/MDA$  i innych reaktywnych związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym, a w mitochondriach, prekursorem cytrynianu-substratu cyklu kwasów trójkarboksylowych. Zwiększona synteza ATP/ADP w mitochondriach może powodować przyspieszenie ich transportu do cytoplazmy, a następnie akumulacji w ziarnistościach gęstych. Wskutek tego, w trakcie aktywacji dochodziłoby do zwiększenia sekrecji ATP/ADP i nadmiernej agregacji krwinek płytkowych w przebiegu cukrzycy (Tabela 8, Ryc. 9). Dodatkowo, zwiększone wydzielanie ATP z płytek pacjentów z cukrzycą może wzmacniać agregację poprzez rozpad ATP do ADP katalizowany przez ekto-ATP-azy obecne na powierzchni płytek. Wskazuje na to ujemny odzysk wydzielonego ATP i dodatni odzysk dla ADP (Ryc. 5 i 6). Co więcej, ATP może bezpośrednio aktywować płytki przez pobudzenie receptora P2X1 i zwiększenie wychwytu serotoniny (Gachet i wsp. 2006, Morimoto i wsp. 1996). Mogłoby to tłumaczyć istnienie silniejszej korelacji pomiędzy ATP, a nie ADP a funkcją krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą (Tabela 12 i 13).

Suramina jest niespecyficznym antagonistą receptorów purynergicznym (Park i Hourani, 1999, Watling, 2001). Zahamowanie przez trombinę wzrostu akumulacji TBARS i agregacji przez trombinę w obu grupach doświadczalnych wskazuje, że pobudzenie receptorów purynergicznym przez wydzielone ATP/ADP stanowi istotny element dodatniego sprzężenia w wywołanej trombiną aktywacji krwinek płytkowych (Ryc. 13 A, B, C, D) (Gachet i wsp. 2006, Holinstat i wsp. 2006, Kahner i wsp. 2006). W płytkach krwi pacjentów z cukrzycą zwiększenie puli ATP/ADP w ziarnistościach wydzielniczym, indukowane przez zwiększony metabolizm acetylo-CoA w mitochondriach, bierze udział w ich nadmiernej aktywności (Ryc. 3, 5, 6, 7, 9, 10,

Tabela 5, 8, 9). Tym samym nadmiar ATP/ADP może być istotnym elementem mechanizmu zwiększonej reaktywności krwinek płytkowych w cukrzycy. Jednakże suramina nie znosiła całkowicie aktywującego efektu trombiny co może świadczyć o tym, że część aktywności pobudzonych płytek zależy od innych dróg metabolicznych niezależnych od receptorów purynergicznych (Ryc. 13 A, B, C, D). Suramina nie odwracała całkowicie aktywowanego przez trombinę spadku poziomu ATP w płytkach, który pozostawał poniżej wartości obserwowanej w płytkach krwi w warunkach spoczynkowych (Ryc. 13 A). Nie hamowała również całkowicie aktywacji syntezy TBARS przez trombinę (Ryc. 13 A i D). Wskazuje to, że poza pobudzeniem receptorów purynergicznych przez ATP inne mechanizmy były zaangażowane w powstawanie nadmiernej aktywacji płytek krwi w cukrzycy. Wydaje się, że aktywacja receptora purynergicznego w aktywowanych trombiną płytkach krwi osób z cukrzycą była dwukrotnie większa niż w płytkach osób zdrowych (Ryc. 13 A, C i D). Świadczy o tym fakt, że suramina powodowała dwukrotnie wyższe odwrócenie spadku zawartości ATP w aktywowanych trombiną płytkach osób z cukrzycą niż w płytkach osób zdrowych (Ryc. 13 A). Natomiast brak wpływu suraminy na poziom ATP, ADP oraz agregację i akumulację TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych obu grup może wynikać z minimalnej sekrecji ATP i ADP z ziarnistości płytek krwi w warunkach spoczynkowych (Ryc. 5, 6, 13 A, B, C, D). Z drugiej strony obserwowany przez nas brak wpływu klopidoogrelu *in vitro* na aktywność płytek można wytłumaczyć tym, że jest on nieaktywną substancją, która musi być metabolizowana *in vivo* do aktywnego antagonisty przez enzymy mikrosomalne wątroby (Pereillo i wsp. 2002, dane nie publikowane). Przedstawione dane świadczą o tym, że zwiększona akumulacja i wydzielanie ATP/ADP w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą ma istotny wpływ na ich zwiększoną aktywność w cukrzycy.

## 6.5. Wpływ cukrzycy na funkcję krwinek płytkowych

### 6.5.1. Wpływ cukrzycy na agregację krwinek płytkowych

Obserwowany przez nas wzrost agregacji spoczynkowej i po aktywacji trombiną jest zgodny z doniesieniami innych autorów (Tabela 8, Ryc. 9) (Iwase i wsp. 1998, Watała i wsp. 1996, Winocour, 1992, 1994, Vericel i wsp. 2004). Fakt istnienia dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem fruktozaminy, a poziomem acetylo-CoA oraz agregacją spontaniczną i po trombinie w krwinkach płytkowych osób z cukrzycą wskazywałaby na istotną rolę glikacji białek płytek krwi w indukowaniu ich nadmiernej aktywności

(Tabela 10 i 11). Świadczy to o tym, że to hiperglikemia, a nie cholesterol całkowity, LDL czy triglicerydy miały istotny wpływ na modyfikację funkcji krwinek płytkowych (Tabela 1, 8, 9, Ryc. 9 i 10). Wskazuje na to fakt, że w obu typach cukrzycy niezależnie od poziomu lipidów w osoczu dystrybucja i średnia wartość agregacji spontanicznej i aktywowanej trombiną były podobne (Ryc. 9, Tabela 1 i 8).

Istnienie znamiennej korelacji pomiędzy poziomem acetylo-CoA, a aktywowaną trombiną agregacją płytek krwi obu grup cukrzyków potwierdza znaczenie tego metabolitu w regulacji ich funkcji (Tabela 11). Istnieje także korelacja między agregacją a poziomem ATP w płytkach (Tabela 12 i 13). Dlatego można sądzić, że agregacja płytek krwi jest wypadkową zmian ich metabolizmu energetycznego zależnego od dostępności acetylo-CoA w mitochondriach (Tabela 5). Wskazuje na to istnienie korelacji pomiędzy poziomami ATP/ADP i sumą ATP+ADP, a agregacją spoczynkową i aktywowaną trombiną (Tabela 12). Zwiększona agregacja płytek krwi pacjentów z cukrzycą jest związana ze wzrostem wewnątrzpłytkowego poziomu obu nukleotydów (Tabela 8, Ryc. 5, 6, 9). Świadczy o tym również znamienna korelacja pomiędzy ilością wydzielonego z płytek krwi pacjentów z cukrzycą ATP i sumy ATP+ADP, a agregacją w obecności trombiny (Tabela 13). Dane dotyczące hamującego wpływu suraminy na wydzielanie ATP/ADP i agregację krwinek płytkowych potwierdzają naszą hipotezę o zależności funkcji płytek od wydzielonych z ich ziarnistości nukleotydów purynowych (Ryc. 13 A, B, C). Wiadomo bowiem, że egzogenne nukleotydy ATP i ADP indukują aktywację krwinek płytkowych zależnie od stężenia (Heptinstall i wsp. 2005). Zgodnie z tym doniesieniem, zależność ta ujawniała się szczególnie wyraźnie przy nadmiernej akumulacji endogennego ATP/ADP w płytkach pacjentów z cukrzycą (Tabela 10 i 11, Ryc. 5, 6, 7).

#### 6.5.2. Wpływ cukrzycy na akumulację TBARS

Wzrost akumulacji TBARS w cukrzycy odzwierciedla wzrost syntezy TBARS, który jest metabolitem powstającym w równomolowych ilościach z  $\text{TXA}_2$  (Makris i wsp. 1985). Zmiany syntezy TBARS są proporcjonalne do zmian syntezy MDA i innych peroksydowanych związków w płytkach krwi reagującymi z kwasem tiobarbiturowym. Dlatego obserwowany przez nas wzrost akumulacji TBARS w płytkach pacjentów z cukrzycą odzwierciedla jednocześnie zwiększenie syntezy  $\text{TXA}_2$  i MDA.

Przewlekła hiperglikemia może być jednym z istotnych czynników odpowiedzialnych za wzrost akumulacji TBARS w płytkach osób z cukrzycą zarówno w warunkach

spoczynkowych, jak i po aktywacji trombiną (Ryc. 10). Świadczy o tym znamienna korelacja pomiędzy stężeniem fruktozaminy w osoczu, a akumulacją TBARS w płytkach krwi obu grup doświadczalnych (Tabela 9 i 10, Ryc. 10). Dane te są zgodne z innymi pracami wykazującymi aktywujący wpływ cukrzycy na syntezę  $\text{TXA}_2$ , peroksydowanych lipidów i czynników aktywujących płytki krwi (Angiolillo i wsp. 2006, Brownlee, 1994, Halushka i wsp. 1997, Vericel i wsp. 2004). Obserwowali oni również korelację pomiędzy stężeniem  $\text{HbA}_{1c}$  i  $\text{TXA}_2$  we krwi pacjentów z cukrzycą (Noberasco i wsp. 1991).

Z drugiej strony inni autorzy wykazywali obniżenie wewnątrzpłytkowej akumulacji MDA u pacjentów z cukrzycą (Zozulińska i Zawilska, 1991). Sugerowali oni, że zjawisko to może być związane z występowaniem u pacjentów z cukrzycą zaburzeń lipidowych niezależnych od hiperglikemii oraz z różnego stopnia kontroli glikemii (Zozulińska i Zawilska, 1991). Ostatnie doniesienia wykazują zależność między hiperlipidemią, a akumulacją TBARS (Palmieri i wsp. 2006).

Nasze badania wykazały jednak, że wartości średnie i dystrybucja wyników akumulacji TBARS w płytkach krwi były podobne dla obu typów cukrzycy, mimo występujących między nimi różnic parametrów gospodarki lipidowej (Tabela 1, Ryc. 10). Może to wynikać z faktu, że nasze doświadczenia były prowadzone na płytkach wyizolowanych z osocza, co eliminowało ewentualny udział egzogennych lipidów osoczowych w modyfikacji funkcji krwinek płytkowych. W tych warunkach akumulacja TBARS w nieaktywowanych płytkach krwi, jak i po ich aktywacji zależała bowiem wyłącznie od zmian wewnątrzpłytkowego metabolizmu glukozy. Świadczy o tym obserwowana przez nas znamienna korelacja pomiędzy poziomem całkowitego acetylo-CoA, a akumulacją TBARS w płytkach osób z cukrzycą zarówno w warunkach spoczynkowych jak i po aktywacji trombiną (Tabela 11). Znamienność korelacji pomiędzy poziomem całkowitego acetylo-CoA i akumulacją TBARS była silniejsza niż korelacji pomiędzy poziomem acetylo-CoA, a agregacją płytek krwi zarówno bez, jak i po aktywacji trombiną (Tabela 11). Może to wynikać z faktu, że acetylo-CoA jest bezpośrednim prekursorem PAF i kwasów tłuszczowych, których peroksydacja zwiększa akumulację TBARS. Natomiast agregacja nie jest stymulowana bezpośrednio przez acetylo-CoA lecz przez zależny od niego wzrost poziomu (syntezy) ATP/ADP i lipidowych aktywatorów krwinek płytkowych (Ryc. 5, 6, 9, 10 Tabela 8, 9, 11). Świadczy o tym istnienie korelacji między poziomem ATP/ADP i sumą ATP i ADP oraz wydzielaniem tych nukleotydów, a akumulacją TBARS w nieaktywowanych i aktywowanych

płytkach krwi osób z cukrzycą (Tabela 12). Hipotezę tą potwierdza też fakt, że w płytkach osób z cukrzycą suramina powodowała ponad dwukrotnie większy spadek syntezy TBARS niż w płytkach osób zdrowych (Ryc. 13).

#### 6.6. Wpływ cukrzycy na poziom transportera glukozy Glut3 krwinek płytkowych

Glukoza jest podstawowym substratem energetycznym, a Glut3 jest jej głównym transporterem do wnętrza krwinek płytkowych (Craik i wsp. 1995, Heijen i wsp. 1997). Krwinki płytkowe ssaków mają zdolność adaptacji do hiperglikemii poprzez zwiększenie transportu glukozy (Bashan i wsp. 1993, Khayat i wsp. 1998). Nasze wyniki wykazujące adaptacyjny wzrost aktywności enzymów związanych z metabolizmem reszty acetylowej i produkcją energii w krwinkach płytkowych ludzi z cukrzycą są zgodne z tymi doniesieniami (Tabela 5 i 6). Z drugiej strony całkowity poziom transportera Glut3 w krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą nie ulegał podwyższeniu (Ryc. 11 i 12). Ta sprzeczność może wynikać z faktu, że przedstawione tu badania nie uwzględniały dystrybucji białka transportera Glut3 między błonami plazmatycznymi i strukturami wewnątrzpłytkowymi (Ryc. 11 i 12). Wiadomo bowiem, że w płytkach nieaktywowanych około 75% transporterów Glut3 znajduje się w ziarnistościach alfa (Craik i wsp. 1995, Heijen i wsp. 1997). Aktywacja krwinek płytkowych trombiną prowadzi do eksternalizacji transportera i zwiększenia napływu glukozy do ich wnętrza (Craik i wsp. 1995, Heijen i wsp. 1997). Można jedynie przypuszczać, że aktywacja trombiną płytek krwi pacjentów z cukrzycą będzie powodować znacznie większą niż w płytkach osób zdrowych eksternalizację transportera Glut3 i tym samym przyspieszy zużycie glukozy (Bashan i wsp. 1993, Khayat i wsp. 1998). Takie badania nie zostały jak dotąd wykonane.

Istnieją dane, że w krwinkach płytkowych obecny jest jeszcze inny dodatkowy mechanizm regulacji transportu glukozy (Ferreira i wsp. 2005). Wiadomo bowiem, że napływ glukozy w aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych jest regulowany przez kinazę białkową B, dla której przy fizjologicznych stężeniach glukozy insulina staje się inhibitorem. Dlatego przy względnym lub bezwzględnym niedoborze insuliny w cukrzycy napływ glukozy do wnętrza krwinek płytkowych mógłby być zwiększony (Ferreira i wsp. 2005). Zwiększony napływ glukozy do wnętrza megakariocytów prowadziłby do wzrostu aktywności PDH i innych enzymów metabolizmu acetylo-CoA (Tabela 6, Ryc. 14). Weryfikacja tej hipotezy wymagałaby zbadania wewnątrzpłytkowej dystrybucji transporterów Glut3 i wykazania ich związku ze zmianami metabolizmu



acetylo-CoA w płytkach krwi w przebiegu cukrzycy.

#### 6.7. Wpływ L-karnityny na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych

L-karnityna zwiększa podaż acetylo-CoA do syntezy kwasów tłuszczowych w wątrobie oraz acetylocholinę w mózgu szczura poprzez aktywację jego transportu z przedziału mitochondrialnego do cytoplazmatycznego za pośrednictwem acetylotransferazy karnitynowej (Bremer, 1983, Giret i Villanueva. 1981, Ricny i wsp. 1992). L-karnityna w obecności glukozy nie miała jednak istotnego wpływu na poziom acetylo-CoA i funkcję krwinek płytkowych osób zdrowych (Ryc. 28, 29, 30 i 31). Stwierdzony przez nas brak wpływu L-karnityny na płytki osób zdrowych może świadczyć o tym, że droga transportu acetylo-CoA poprzez acetylotransferazę karnitynową nie odgrywa roli w regulacji funkcji płytek krwi w warunkach fizjologicznych (Ryc. 28, 29, 30, 31). Dane te są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali brak wpływu propionyl-L-karnityny na syntezę PAF i metabolizm kwasu arachidonowego w płytkach osób zdrowych (Pignatelli i wsp. 2003, Triggiani i wsp. 1999). Pozwala to sądzić, że ta droga transportu acetylo-CoA jest w warunkach fizjologicznych nieaktywna, pomimo obecności aktywności acetylotransferazy karnitynowej. Może to wynikać z faktu, że przy fizjologicznym stężeniu acetylo-CoA w krwinkach płytkowych jest on zużywany głównie w cyklu kwasów trójkarboksylowych i nie jest dostępny dla acetylotransferazy karnitynowej. Maksymalny, 81 % wzrost poziomu acetylo-CoA w płytkach pacjentów z cukrzycą był obserwowany przy 2.5 mM stężeniu L-karnityny. Natomiast fizjologiczne stężenia L-karnityny w tkance mózgowej było nieco niższe i wynosiło średnio 0.75  $\mu\text{mol/g}$ , a w mięśniach szkieletowych 1.64  $\mu\text{mol/g}$ . W surowicy krwi stężenie L-karnityny waha się od 21 do 67  $\mu\text{mol/l}$  (Ryc. 28) (Angelini i wsp. 1992, Haeckel i wsp. 1990). Jednak już 50  $\mu\text{molowe}$ , stężenie L-karnityny odpowiadające jej poziomowi w płynie pozakomórkowym powodowało 19 % wzrost poziomu acetylo-CoA w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą (Ryc. 28). Stąd można wnioskować, że odkryte przez nas zjawisko, może mieć istotne znaczenie w patomechanizmie nadmiernej reaktywności krwinek płytkowych *in vivo* w przebiegu cukrzycy. Fakt, że L-karnityna zwiększała poziom całkowitego i cytoplazmatycznego acetylo-CoA w płytkach osób z cukrzycą w środowisku zawierającym glukozę może świadczyć o tym, że przewlekła hiperglikemia aktywuje przepływ reszt acetylowych przez drogę acetylo-transferazy karnitynowej (Ryc. 28, 29). Jednak cukrzyca powodowała aż 4-krotny wzrost poziomu acetylo-CoA w cytoplazmie płytek krwi przy zaledwie 20% zwiększeniu aktywności

acetylotransferazy karnitynowej (Ryc. 28 i 29) (Skibowska, 2000). Sugeruje to, że nie tyle wzrost aktywności acetylo-transferazy karnitynowej, a zwiększenie dostępności acetylo-CoA dla tego enzymu w mitochondriach może przyspieszać jego transport do przedziału cytoplazmatycznego (Ryc. 29). Za takim wyjaśnieniem tego zjawiska przemawia fakt, że poziom acetylo-CoA w mitochondriach krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą był o 69% wyższy niż w grupie osób zdrowych i ulegał podwyższeniu o dalsze 27% w obecności L-karnityny (Tabela 5, Ryc. 29). Zgodnie z naszą hipotezą zwiększenie przez L-karnitynę agregacji i akumulacji TBARS w nieaktywowanych krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą mogło być związane ze zwiększoną dostępnością acetylo-CoA w przedziale cytoplazmatycznym (Tabela 5, Ryc. 29, 30 i 31). Co więcej, dane te wskazują, że wysoki poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA w warunkach spoczynkowych może być przyczyną zwiększonej odpowiedzi krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą na trombinę (Tabela 8, 9, Ryc. 9, 10, 29, 30 i 31). Aktywacja krwinek płytkowych pacjentów z cukrzycą przez trombinę powodowała spadek poziomu acetylo-CoA do poziomu wykazywanego u ludzi zdrowych (Tabela 5). Może to świadczyć o zużyciu „nadmiaru” acetylo-CoA przy nadmiernej aktywacji krwinek płytkowych w cukrzycy (Tabela 5, 8, 9 Ryc. 3, 9, 10, 28-31). Interpretacja taka jest zgodna z wykazanymi w tej pracy znamienymi korelacjami pomiędzy poziomem acetylo-CoA, a akumulacją TBARS i agregacją płytek krwi pacjentów z cukrzycą (Tabela 11).

Dane te są niezgodne z doniesieniami innych autorów (Pignatelli i wsp. 2003). Wykazali oni, że przyjmowanie propionilo-L-karnityny przez pacjentów z cukrzycą powodowało zahamowanie agregacji płytek krwi aktywowanych kolagenem poprzez zmniejszenie szybkości utleniania kwasu arachidonowego i syntezy reaktywnych form tlenu (Pignatelli i wsp. 2003). Rozbieżność ta może wynikać z faktu, że nasze badania z L-karnityną były wykonywane w warunkach *in vitro*, z użyciem trombiny, a nie kolagenu jako aktywatora (Ryc. 30 i 31). Nasze badania są natomiast zgodne z pracami, które wykazywały zmniejszenie agregacji płytek krwi *in vitro* przez inhibitory acylo-transferazy karnitynowej I. Ich autorzy sugerowali, że wzrost metabolizmu acylo-karnityny może raczej zwiększać, a nie zmniejszać aktywność krwinek płytkowych (Willoughby i wsp. 1998). Wydaje się, że zbadanie wpływu tych inhibitorów na poziom acetylo-CoA w płytkach osób z cukrzycą *in vitro* mogłoby zweryfikować naszą teorię o zwiększonym przepływie tego metabolitu poprzez drogę acetylo-transferazy karnitynowej w cukrzycy. Z drugiej strony, zwiększenie przez L-karnitynę poziomu

acetylo-CoA w cytoplazmie i zwiększenie aktywności płytek krwi pacjentów z cukrzycą stanowi pośredni dowód na istnienie aktywacji tego transportu przez błonę mitochondrialną (Ryc. 29, 30 i 31).

Brak wpływu L-karnityny na poziom ATP w krwinkach płytkowych obu badanych grup może wynikać z tego, że stymuluje ona głównie transport acetylo-CoA do cytoplazmy (Tabela 16). Świadczy to o tym fakt, że w płytkach pacjentów z cukrzycą, L-karnityna powodowała wyższy, względny wzrost acetylo-CoA w cytoplazmie niż w mitochondriach (Ryc. 29). Przedstawione dane pozwalają na przybliżoną ocenę wpływu L-karnityny na wielkość przyrostu puli acetylo-CoA w poszczególnych przedziałach komórkowych krwinek płytkowych (Ryc. 30). Zawartość białka mitochondrialnego w płytkach krwi stanowi tylko 25 % białka całkowitego płytek (Tabela 4). Dlatego w liczbach bezwzględnych, L-karnityna powodowała sześciokrotnie większy przyrost pozamitochondrialnej niż mitochondrialnej puli acetylo-CoA (Ryc. 29). Wskazuje to, że w krwinkach płytkowych pacjentów z cukrzycą, tak jak i w innych tkankach, L-karnityna zwiększa transport acetylo-CoA do cytoplazmy (Ryc. 29) (Bremer, 1983). Z drugiej strony wzrost poziomu acetylo-CoA w mitochondriach płytek krwi pacjentów z cukrzycą może wynikać z przyspieszenia przez L-karnitynę transportu wolnych kwasów tłuszczowych do mitochondriów, gdzie w procesie  $\beta$ -oksydacji dostarczałby one dodatkowych ilości acetylo-CoA. Ta dodatkowa zależna od L-karnityny pula mitochondrialnego acetylo-CoA w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą byłaby przy tym dostępna dla acetylotransferazy karnitynowej i transportowana głównie do przedziału cytoplazmatycznego (Ryc. 29). O niedostępności puli mitochondrialnego acetylo-CoA zależnego od L-karnityny dla cyklu kwasów trójkarboksylowych świadczyłby również fakt, że związek ten nie zwiększał poziomu acetylo-CoA i ATP w płytkach, w których aktywność PDH została zahamowana przez 3-BrPG (Tabela 17). Tak więc podawanie L-karnityny pacjentom z cukrzycą może mieć efekt uboczny w postaci zwiększenia tendencji krwinek płytkowych do aktywacji. Ewentualne korzystne działanie tego związku może wiązać się z poprawą metabolizmu energetycznego innych tkanek takich jak: mięśnie, tkanka tłuszczowa i wątroba. Istotnym pozytywnym efektem byłoby również przyspieszenie spalania kwasów tłuszczowych w procesie mitochondrialnej i mikrosomalnej  $\beta$ -oksydacji (Bremer, 1983).

## 6.8. Wpływ inhibitorów przemian energetycznych na funkcję krwinek płytkowych

### 6.8.1. Wpływ 3-bromopirogronianu na przemiany energetyczne i funkcję krwinek płytkowych

Inhibicja PDH hamowała szereg dróg metabolicznych i funkcję w różnych tkankach, które zależą od podaży acetylo-CoA do cytoplazmy (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Burton i wsp. 1995, Dutschke i wsp. 1994). I tak, inhibicja PDH hamowała syntezę i wydzielanie acetylocholino w neuronach cholinergicznym (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Burton i wsp. 1995). Istotnym następstwem inhibicji było również ograniczenie dostępności acetylo-CoA dla cyklu kwasów trójkarboksylowych i obniżenie zawartości ATP w komórkach (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Burton i wsp. 1995, Dutschke i wsp. 1994). Płytki krwi posiadają duże pule pozamitochondrialnego ATP/ADP, które są zgromadzone w ziarnistościach wydzielniczych i spełniają istotną rolę w ich aktywacji i agregacji (White, 2002). Przedstawione w tej pracy doświadczenia z użyciem inhibitorów mitochondrialnego metabolizmu acetylo-CoA miały na celu wykazanie współzależności między jego syntezą i zużyciem acetylo-CoA w mitochondriach, a funkcją płytek krwi w cukrzycy (Ryc. 14, 15, 17, 18, 21 i 22, Tabela 14).

Inhibycyjny wpływ 3-BrPG na aktywność PDH w krwinkach płytkowych osób zdrowych i z cukrzycą jest zgodny z doniesieniami innych autorów (Ryc.14). Wykazali oni podobne działanie tego związku na aktywność PDH w komórkach neuronalnych i nowotworowych (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Burton i wsp. 1995, Dutschke i wsp. 1994).

Dwufazowy charakter krzywych inhibicji PDH przez 3-BrPG świadczy o istnieniu przynajmniej dwóch miejsc wiążących, odpowiednio o wysokim i niskim powinowactwie do tego inhibitora (Ryc. 14 A, B i C). Przypuszczalnie miejsca te są zlokalizowane odpowiednio na podjednostkach E<sub>1</sub> i E<sub>2</sub> kompleksu PDH (Apfel i wsp. 1984, Lowe i Perham, 1984). I tak, w płytkach krwi jedno z miejsc wiążących miało wysokie powinowactwo ( $K_i=0.03$ , Ryc. 14 C), zaś drugie- niskie powinowactwo ( $K_i=0.75$ ) do 3-BrPG (Ryc. 14 B). Nasze doświadczenia nie pozwalają jednak na identyfikację, która z podjednostek cechuje się niskim, a która wysokim powinowactwem do tego inhibitora. Podobne wartości  $K_i$  dla miejsc o wysokim i niskim powinowactwie 3-BrPG do PDH płytek osób zdrowych i z cukrzycą wskazują, że przewlekła hiperglikemia i ewentualna glikacja białek płytkowych nie modyfikowały powinowactwa enzymu do tego inhibitora (Tabela 1, Ryc. 2, 14). Jednakże 3-BrPG miał większy inhibycyjny wpływ na aktywność tego enzymu w płytkach osób z cukrzycą niż

u osób zdrowych (Ryc. 14). Może to wynikać z faktu, że wobec wyższej aktywności PDH w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą, podobna procentowo inhibicja aktywności przez 3-BrPG dawała większy bezwzględny spadek aktywności PDH (Ryc. 14). W rezultacie przy wysokich stężeniach 3-BrPG aktywności PDH w obu badanych grupach stawały się porównywalne (Ryc. 14). Świadczy to o tym, że „nadmiar” acetylo-CoA w płytkach pacjentów z cukrzycą jest spowodowany zwiększoną aktywnością tego enzymu (Tabela 5, Ryc. 3 i 14).

W płytkach osób zdrowych w warunkach spoczynkowych, 3-BrPG w stężeniu 0.1mM powodował spadek poziomu acetylo-CoA jedynie we frakcji mitochondrialnej natomiast w płytkach osób z cukrzycą zarówno we frakcji mitochondrialnej jak i cytoplazmatycznej (Tabela 14). Wyraźniejszy supresyjny wpływ 3-BrPG na poziom acetylo-CoA w płytkach osób z cukrzycą można tłumaczyć większą wrażliwością PDH na ten inhibitor (Tabela 14). Poprzez ograniczenie syntezy acetylo-CoA w mitochondriach, 3-BrPG ograniczałby wtórnie poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA wskutek zmniejszenia jego dostępności dla układów jego transportu przez błonę mitochondrialną (Tabela 5 i 14, Ryc. 3). W płytkach krwi aktywowanych trombiną zanik lub zmniejszenie supresyjnego działania 3-BrPG na poziom acetylo-CoA wynika z faktu, że już sama aktywacja powodowała przesunięcie tego metabolitu z mitochondriów do cytoplazmy i jego zużycie w procesach aktywacji. Tym samym nie dochodziło do dalszego obniżenia acetylo-CoA przez 3-BrPG (Tabela 14). Obniżenie przez 3-BrPG zawartości ATP w płytkach krwi obu grup zarówno w warunkach spoczynkowych, jak i po aktywacji oraz spadek ilości wydzielanego ATP z aktywowanych płytek krwi może świadczyć o tym, że cykl kwasów trójkarboksylowych pełni ważną rolę w syntezie płytkowego ATP i jego transporcie do puli wydzielniczej (Ryc. 5, 7, 16 i 19). Fakt, że po 3-BrPG spadek ATP był dwukrotnie większy w płytkach osób z cukrzycą niż w płytkach osób zdrowych przemawia za jego istotną rolę w odpowiedzi płytek krwi na hiperglikemię (Tabela 1, Ryc. 5, 7, 16, 19).

Obserwowany 40% spadek poziomu ATP w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych w obecności 3-BrPG jest zgodny z obserwacjami innych autorów, którzy wykazali, że cykl kwasów trójkarboksylowych i sprzężony z nim łańcuch oddechowy dostarczają około 50% płytkowego ATP (Ryc. 19) (Brown i wsp. 1999). Z kolei ponad 60% spadek poziomu ATP w płytkach pacjentów z cukrzycą po dodaniu 3-BrPG świadczy o tym, że patologia ta powoduje znacznie większe uzależnienie syntezy tego metabolitu od utleniania acetylo-CoA w cyklu kwasów

trójkarbosylowych (Ryc. 19). Zgodnie z tym, odpowiednio wysoka inhibicja agregacji i akumulacji TBARS w płytkach pacjentów z cukrzycą przez 3-BrPG, świadczy o tym, że wzrost tych parametrów w cukrzycy zależy od wzmożonej produkcji acetylo-CoA przez PDH i związanej z tym aktywacji syntezy ATP (Ryc. 16-19, 21 i 22). Dane te pozostają również w zgodzie z doniesieniami, wykazującymi brak wpływu 3-BrPG na szybkość szlaku glikolitycznego, który w płytkach krwi dostarcza około 50% syntetyzowanego ATP (Brown i wsp. 1994, Ramsey i wsp. 2006). Brak wpływu 3-BrPG na poziom i uwalnianie ADP w nieaktywowanych płytkach krwi obu badanych grup może świadczyć o tym, że jego poziom jest bardziej stabilny niż ATP i nie zależy od krótkoterminowych zmian produkcji energii w płytkach krwi (Ryc. 20). Może to również wynikać z faktu, że przy zahamowaniu metabolizmu acetylo-CoA, część ATP ulegała prawdopodobnie rozkładowi do ADP (Heptinstall i wsp. 2005).

Wcześniejsze dane sugerują, że ilość ATP zsyntetyzowanego w cyklu glikolitycznym wydaje się być wystarczająca do agregacji wywołanej trombiną (Tomasiak i wp. 2004). Nie jest to zgodne z obserwowaną przez nas inhibicją przez 3-BrPG agregacji i akumulacji TBARS w aktywowanych trombiną płytkach osób zdrowych (Ryc.17, 18, 21, 22). Glikoliza nie zabezpieczała 50% funkcji płytek osób z cukrzycą, w których spadek agregacji po zastosowaniu 3-BrPG był dwukrotnie wyższy niż w płytkach osób zdrowych (Ryc. 18 i 21). Nasze badania wykazały bowiem, że w nieaktywowanych krwinkach płytkowych osób zdrowych przy 30% spadku ATP obserwowano podobny stopień spadku agregacji i akumulacji TBARS (Ryc. 16-18, 19, 21 i 22). Wskazuje to, że przynajmniej w 30% funkcja płytek krwi osób zdrowych zależy od procesów oksydacyjnych. Co więcej, w nieaktywowanych płytkach krwi pacjentów z cukrzycą zahamowanie utleniania pirogronianu przez 3-BrPG powodowało znacznie większy spadek zawartości ATP i odpowiednią do tego inhibicję agregacji spoczynkowej i akumulacji TBARS (Ryc. 16-19, 21 i 22). Natomiast w aktywowanych krwinkach płytkowych, 3-BrPG powodował 80% spadek całkowitego poziomu ATP, zarówno u osób zdrowych, jak i z cukrzycą, powodując jednocześnie relatywnie mniejszy spadek agregacji i akumulacji TBARS (Ryc. 19, 21 i 22). Z drugiej strony spadek agregacji i akumulacji TBARS w płytkach pacjentów z cukrzycą był ponad dwa razy większy niż w płytkach osób zdrowych. Mogło to być spowodowane tym, że nadmiernie zwiększona funkcja zależała głównie od syntezy ATP w cyklu kwasów trójkarbosylowych (Tabela 6, Ryc. 19, 21 i 22). Należy wziąć również pod uwagę możliwość, że inhibicja funkcji płytek przez 3-BrPG mogła wynikać z zahamowania

przez ten inhibitor wydzielania ATP niezależnie od tego czy pochodził on ze szlaku glikolizy czy cyklu kwasów trójkarboksylowych (Tabela 6, Ryc. 19, 21, 22).

#### 6.9. Wpływ 3-nitropropionianu na metabolizm energetyczny i funkcję krwinek płytkowych

Cukrzyca nie powodowała wzrostu aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (SDH) w krwinkach płytkowych (Ryc. 23). Wskazuje to, że poziom tego enzymu nie podlega zmianom adaptacyjnym pod wpływem przewlekłej hiperglikemii. Tym samym SDH nie odgrywałaby istotnej roli w mechanizmie zwiększonej aktywności płytek krwi w cukrzycy. Wskazuje na to również fakt, że 10mM 3-NPA, który powodował zahamowanie aktywności SDH nie wpływał na funkcję krwinek płytkowych. Równoczesny nieznaczny wzrost poziomu acetylo-CoA mógł wynikać z jego zmniejszonego zużycia w cyklu kwasów trójkarboksylowych przy niezmienionej syntezie przez PDH (Greene i wsp. 1998, Zeevalk i wsp. 1995) (Ryc. 23-27). Fakt, że wywołany przez 3-NPA względny wzrost poziomu acetylo-CoA w płytkach obu badanych grup był podobny, przemawia za tym, że SDH nie bierze udziału w powstawaniu zwiększonej puli ATP w płytkach cukrzycowych (Ryc. 24). Brak istotnego wpływu 3-NPA na funkcję krwinek płytkowych, może również wynikać z tego, że spadkowi poziomu ATP towarzyszył jednocześnie wzrost poziomu ADP (Ryc. 25 A i B, 26 i 27). Tym samym pula nukleotydów zaangażowanych w aktywację receptorów purynergicznych nie uległa zmianie w obecności 3-NPA. Pozwalałoby to na utrzymanie stałego poziomu agregacji i akumulacji TBARS w obecności tego inhibitora (Ryc. 27 i 28). W płytkach aktywowanych obu grup doświadczalnych czynnikiem sprzyjającym podtrzymywaniu funkcji płytek w obecności 3-NPA był również nieznaczny wzrost stężenia acetylo-CoA (Ryc. 25, 27 i 28). Utrzymywałoby to przypuszczalnie pulę lipidowych aktywatorów płytek krwi na niezmienionym poziomie (Ryc. 26 i 27). Dane te wskazują, że etap dehydrogenazy bursztynianowej nie odgrywa roli w mechanizmie powstawania zwiększonej aktywności płytek krwi w cukrzycy (Tabela 5, 8 i 9, Ryc. 23, 26 i 27).

#### 6.10. Wpływ inhibitorów liazy ATP-cytrynianowej na metabolizm i funkcję krwinek płytkowych

Badania porównawcze przeprowadzone na krwinkach płytkowych osób chorych na cukrzycę i zdrowych z użyciem inhibitorów liazy ATP-cytrynianowej ((-)HC i SB-

204990) wykazały, że wydajność tej drogi metabolicznej transportu reszt acetylowych zwiększa się w przebiegu cukrzycy (Tabela 17). Są one zgodne z badaniami wiążącymi aktywację płytek krwi z transportem acetylo-CoA do cytoplazmy (Tabela 5, 8, 9, Ryc. 29, 30 i 31). Wzrost aktywności liazy ATP-cytrynianowej może być zarówno wynikiem posttranslacyjnej modyfikacji, jak i zwiększonej syntezy (Pearce i wsp. 1997, Skibowska, 2000). Zgodnie z przewidywaniami zarówno SB jak i (-)HC hamowały aktywność liazy ATP-cytrynianowej w homogenatach płytek krwi obu badanych grup (Tabela 17). Powyższe obserwacje są zgodne z wynikami badań wykazującymi spadek poziomu acetylo-CoA i wzrost akumulacji cytrynianu w zakończeniach nerwowych mózgu i wątrobie w obecności (-)HC (Bielarczyk i Szutowicz, 1989, Szutowicz i Angielski, 1970, Pearce i wsp. 1998).

Pozostaje jednak niewyjaśnionym fakt, dwukrotnie większej inhibicji aktywności liazy ATP-cytrynianowej w płytkach cukrzycowych przez SB (Tabela 17). Wynik ten niezależnie od mechanizmu inhibicji wskazuje na to, że za podwyższenie poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA w płytkach pacjentów z cukrzycą odpowiedzialny był wzrost aktywności liazy ATP-cytrynianowej (Tabela 5 i 17). Z kolei obniżenie przez SB i (-)HC agregacji i akumulacji TBARS w aktywowanych trombiną płytkach pacjentów z cukrzycą do poziomu płytek osób zdrowych, świadczy o tym, że „nadmiar” acetylo-CoA generowany przez ten enzym w cytoplazmie jest odpowiedzialny za nadmierną reaktywność pobudzonych płytek krwi w cukrzycy (Tabela 8, 9 i 18). Natomiast brak wpływu SB i (-)HC na aktywność płytek w warunkach spoczynkowych wskazuje, że droga transportu acetylo-CoA przez liazę ATP-cytrynianową ma istotne znaczenie dla funkcji płytek wyłącznie podczas ich aktywacji (Tabela 5, 17 i 18). Fakt, że ani SB, ani (-)HC nie powodowały całkowitej, a jedynie 60-70% inhibicję aktywacji płytek krwi przez trombinę, wskazuje, że oprócz podaży cytoplazmatycznego acetylo-CoA inne czynniki determinują odpowiedź płytek na bodźce aktywujące (Tabela 17 i 18). Nie wyklucza to faktu, że droga liazy ATP-cytrynianowej w krwinkach płytkowych spełnia ważną rolę w patomechanizmie nadkrzepliwości u pacjentów z cukrzycą.

W podsumowaniu, można postawić tezę, że przewlekła hiperglikemia powoduje adaptacyjną aktywację szeregu enzymów zaangażowanych w przemianę glukozy do acetylo-CoA. Wzrost poziomu mitochondrialnego acetylo-CoA zwiększa jego zużycie w cyklu kwasów trójkarboksylowych oraz cytoplazmatycznych procesach syntezy lipidowych aktywatorów płytek krwi. Tym samym zaburzenia metabolizmu acetylo-



CoA i ATP mogą być ważnym elementem mechanizmu łączącego przewlekłą hiperglikemię z nadmierną aktywnością płytek krwi w cukrzycy.

## 7. WNIOSKI

Przedstawione wyniki pozwalają na sformułowanie zintegrowanej hipotezy dotyczącej nadmiernej aktywności płytek wynikającej ze zmian metabolizmu acetylo-CoA i metabolizmu energetycznego.

1. Przewlekła hiperglikemia w cukrzycy powoduje adaptacyjny wzrost aktywności enzymów cyklu glikolitycznego, dehydrogenazy pirogronianowej, innych enzymów metabolizmu acetylo-CoA i cyklu kwasów trójkarboksylowych.
2. Wzrost aktywności PDH prowadzi do zwiększenia poziomu acetylo-CoA w mitochondriach i cytoplazmie płytek krwi pacjentów z cukrzycą.
3. Wzrost poziomu acetylo-CoA w mitochondriach aktywuje syntezę cytrynianu i cykl kwasów trójkarboksylowych oraz transport tego metabolitu do cytoplazmy.
4. Aktywacja cyklu kwasów trójkarboksylowych zwiększa syntezę ATP/ADP w mitochondriach i przyspiesza ich akumulację w ziarnistościach wydzielniczych pacjentów z cukrzycą. Poprzez zwiększenie poziomu i wydzielania ATP/ADP w aktywowanych trombiną krwinkach płytkowych, cukrzyca może przez wzrost aktywacji receptorów purynergicznych powodować nadmierną reaktywność płytek krwi w przebiegu tej choroby.
5. Zwiększenie poziomu acetylo-CoA w mitochondriach płytek krwi pacjentów z cukrzycą, zwiększa jego transport do cytoplazmy za pośrednictwem acetylo-transferazy karnitynowej. Tłumaczy to stymulujący wpływ L-karnityny na poziom cytoplazmatycznego acetylo-CoA i aktywność płytek krwi w cukrzycy.
6. Zwiększenie syntezy cytrynianu i aktywacja drogi liazy ATP-cytrynianowej w płytkach krwi pacjentów z cukrzycą mogły być przyczyną wzrostu poziomu cytoplazmatycznego acetylo-CoA.
7. Istnienie znamiennych korelacji między poziomem acetylo-CoA, ATP i parametrami funkcji płytek krwi w cukrzycy wskazuje, że poszczególne komponenty metabolizmu acetylo-CoA tworzą jednostkę czynnościową odpowiadającą w sposób skoordynowany na przewlekłą hiperglikemię.

8. Zmiany metabolizmu acetylo-CoA spełniają kluczową rolę w patomechanizmie nadmiernej aktywności krwinek płytkowych u pacjentów z cukrzycą.

## 8. PIŚMIENICTWO

1. Akkerman JW. Regulation of Carbohydrate Metabolism in Platelets. *Thromb. Haemost.*, 1978; 39: 712-722.
2. Akkerman JW, Holmsen H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca<sup>2+</sup> secretion. *Blood*. 1981; 57: 956-966.
3. Akkerman JW, Driver HA, Dangelmaier CA, Holmsen H. Alterations in <sup>32</sup>P-labelled intermediates during flux activation of human platelet glycolysis. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 802: 221-228.
4. Akkerman JWN, Rijkse G, Gorter G, Staal GEJ. Platelet functions and energy metabolism in a patient with hexokinase deficiency. *Blood* 63:147-153, 1984.
5. Alberts AW, Ferguson K, Hennessy S, Vagelos PR. Regulation of lipid synthesis in cultured animal cells. *J Biol Chem*. 1974; 25:5241-5249.
6. Alevriadou BR, Moake JL, Turner NA, Ruggeri ZM, Folie BJ, Phillips MD, Schreiber AB, Hrinda ME, McIntire LV. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood*. 1993; 81:1263-1276.
7. Angelini C, Vergani L, Martinuzzi A. Clinical and biochemical aspects of carnitine deficiency and insufficiency: transport defects and inborn errors of beta-oxidation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1992; 29: 217-242.
8. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Clopidogrel withdrawal is associated with proinflammatory and prothrombotic effects in patients with diabetes and coronary artery disease. *Diabetes* 2006; 55: 780-784.
9. Apfel MA, Ikeda BH, Speckhard DC, Frey PA. Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex. Thiamin pyrophosphate-dependent inactivation by 3-bromopyruvate. *J Biol Chem*. 1984; 10: 2905-2909.
10. Ashby B, Daniel JL, Smith JB. Mechanisms of platelet activation and inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1990; 4: 1-26.
11. Baker JR, Zyzak DV, Thorpe SR, Baynes JW. Chemistry of the fructosamine assay: D-glucosone is the product of oxidation of Amadori compounds. *Clin Chem*. 1994 ;40: 1950-1955.
12. Barry FA, Gibbins JM. Protein kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI. *J Biol Chem*. 2002; 12: 12874-12878.
13. Bashan N, Burdett E, Guma A, Sargeant R, Tumiati L, Liu Z, Klip A. Mechanisms of adaptation of glucose transporters to changes in the oxidative chain of muscle and fat cells. *Am J Physiol*. 1993; 264: C430-440
14. Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci*. 1993; 13: 4181-4192.
15. Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, Vilaire G, Qi W, Kapoor SC, Murphy S, FitzGerald GA. Effect of the P1(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. *Blood*. 2001; 97: 3093-3099.
16. Bielarczyk H, Szutowicz A. Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in acetylcholine synthesis in nerve endings. *Biochem J*. 1989; 262: 377-380.

17. Bodor ET, Waldo GL, Hooks SB, Corbitt J, Boyer JL, Harden TK. Purification and functional reconstitution of the human P2Y<sub>12</sub> receptor. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 1210-1216.
18. Born G.V.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962, 194, 927-929.
19. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
20. Bremer J. Carnitine metabolism and functions. *Physiol Rev.* 1983; 63:1420-1480.
21. Bresler M, Gumprecht J. Platelet function in patients with diabetes mellitus *Pol Arch Med Wewn.* 1993; 89: 321-325.
22. Brown AS, Hong Y, de Belder A, Beacon H, Beeso J, Sherwood R, Edmonds M, Martin JF, Erusalimsky JD. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 802-807.
23. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp.* 1999; 66: 17-25.
24. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
25. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes.* 1994 Jun; 43: 836-41.
26. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005 Jun; 54: 1615-1625.
27. Bugert P., Schedel A., Schloss P., Kluter H.: The dopaminergic system of human platelets. Lodz Platelet Conference jointly with 11th Erfurt Conference on Platelets June 25th - 28th, 2006 Lodz, Poland: abstract book, report session, s. 4.
28. Burton MD, Nouri M, Kazemi H. Acetylcholine and central respiratory control: perturbations of acetylcholine synthesis in the isolated brainstem of the neonatal rat. *Brain Res.* 1995; 670: 39-47.
29. Calles-Escandon J, Garcia-Rubi E, Mirza S, Mortensen A. Type 2 diabetes: one disease, multiple cardiovascular risk factors. *Coron Artery Dis.* 1999; 10: 23-30.
30. Calles-Escandon J, Mirza SA, Sobel BE, Schneider DJ. Induction of hyperinsulinemia combined with hyperglycemia and hypertriglyceridemia increases plasminogen activator inhibitor 1 in blood in normal human subjects. *Diabetes.* 1998; 47: 290-293.
31. CAPRIE. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet.* 1996; 348: 1329-1339.
32. Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A<sub>2</sub> production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: E101-106.
33. Choi CH, Zimon A, Usheva A. Metabolic stress regulates basic transcription through acetyl-coenzyme A. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 625-628.
34. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 111-116.

35. Cohen RA. Pathways controlling healthy and diseased arterial smooth muscle. *Am J Cardiol.* 1993; 72: 39C-46C;
36. Coles CJ, Edmondson DE, Singer TP. *J Biol Chem.* Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. 1979; 254: 5161-5167.
37. Collier A, Watson HHK, Matthews DM, Strain L, Ludlam CA, Clarke BF. Platelet-density analysis and intraplatelet granule content in young insulin-dependent diabetics. *Diabetes* 1986; 35: 1081-1084.
38. Collins AS. Pivotal Role of Platelets in Critical Illness: Evidence Behind Clinical Interventions. *Dimens Crit Care Nurs.* 2004;23: 217-221.
39. Colwell JA, Nesto RW. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. *Diabetes Care.* 2003; 26:2181-2188.
40. Cosentino F, Luscher TF. Endothelial function in coronary artery disease. *Cardiologia.* 1997; 42: 1221-1227.
41. Craik JD, Stewart M, Cheeseman CI. GLUT-3 (brain-type) glucose transporter polypeptides in human blood platelets. *Thromb Res.* 1995; 79: 461-9.
42. Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat Med.* 2004; 10: 982-986.
43. D'Souza L, Glueck HI. Measurement of nucleotide pools in platelets using high pressure liquid chromatography. *Thrombos Haemostas* 1977; 38: 990-1001.
44. D'Argenio G, Calvani M, Casamassimi A, Petillo O, Margarucci S, Rienzo M, Peluso I, Calvani R, Ciccodicola A, Caporaso N, Peluso G. Related Articles,. Experimental colitis: decreased Octn2 and Atb0+ expression in rat colonocytes induces carnitine depletion that is reversible by carnitine-loaded liposomes. *FASEB J.* 2006; 20: 2544-2546.
45. De Villafranca GW, Haines VE. Paramyosin from arthropod cross-striated muscle. *Comp Biochem Physiol B.* 1974; 47: 9-26.
46. Di Simplicio P, de Giorgio LA, Cardaioli E, Lecis R, Miceli M, Rossi R, Anichini R, Mian M, Seghieri G, Franconi F. Glutathione, glutathione utilizing enzymes and thioltransferase in platelets of insulin-dependent diabetic patients: relation with platelet aggregation and with microangiopathic complications. *Eur J Clin Invest.* 1995; 25: 665-669.
47. Dutschke K, Nitsch RM, Hoyer S. Short-term mental activation accelerates the age-related decline of high-energy phosphates in rat cerebral cortex. *Arch Gerontol Geriatr.* 1994; 19: 43-51.
48. Eckel RH, Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic disease. *N Engl J Med.*, 1989, 320, 1060-1068.
49. Fahien L.A., Cohen P.P.: L-glutamate dehydrogenase (Frog and tadpole liver) w *Methods in Enzymology* (red. Tabor H., Tabor C.W.) t. 17, str. 839-40, Academic Press, New York, 1970.
50. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001; 108: 785-791.
51. Ferreira IA, Eybrechts KL, Mocking AI, Kroner C, Akkerman JW. IRS-1 mediates inhibition of Ca<sup>2+</sup> mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi. *J Biol Chem.* 2004; 279: 3254-3264.
52. Ferreira IA, Mocking AI, Urbanus RT, Varlack S, Wnuk M, Akkerman JW. Glucose uptake via glucose transporter 3 by human platelets is regulated by protein kinase B. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32625-32633.

53. Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, Gorter G, van Haeften TW, Heemskerk JW, Akkerman JW. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 417-422.
54. Freedman JE, Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 1183-1188.
55. Gachet C, Leon C, Hechler B. Related Articles, The platelet P2 receptors in arterial thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36: 223-227.
56. Garcia-Sevilla JA, Padro D, Giralt MT, Guimon J, Areso P. Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of platelet adenylate cyclase and induction of aggregation in major depression. Effect of long-term cyclic antidepressant drug treatment. *Arch Gen Psychiatry.* 1990; 47:125-132.
57. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem.* 1996; 271:18095-18099.
58. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 1997; 413:255-259.
59. Gibbins JM, Briddon S, Shutes A, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Watson SP. The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor gamma-chain and linker for activator of T cells (LAT) in platelets stimulated by collagen and convulxin. *J Biol Chem.* 1998; 273: 34437-34443.
60. Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem.* 1991; 266: 17261-17268.
61. Giret M, Villanueva VR. On the presence of carnitine acetyl transferase in human platelets. *Mol Cell Biochem.* 1981; 37:65-69.
62. Glenn JR, White AE, Johnson A, Fox SC, Behan MW, Dolan G, Heptinstall S. Leukocyte count and leukocyte ecto-nucleotidase are major determinants of the effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on platelet aggregation in human blood. *Platelets.* 2005 May-Jun;16(3-4):159-70.
63. Glock GE, McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J.* 1953; 55: 400-408.
64. Gorman MW, Marble DR, Ogimoto K, Feigl EO. Measurement of adenine nucleotides in plasma. *Luminescence* 2003; 18: 173-181.
65. Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience.* 1998; 84: 503-510.
66. Gulliksson H, AuBuchon JP, Vesterinen M, Sandgren P, Larsson S, Pickard CA, Herschel I, Roger J, Tracy JE, Langweiler M; Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. 2002; 82: 131-136.
67. Guppy M, Abas L, Arthur PG, Whisson ME. The Pasteur effect in human platelets: implications for storage and metabolic control. *Br J Haematol.* 1995; 91: 752-757.
68. Gurguis GN, Vo SP, Griffith JM, Rush AJ. Platelet alpha2A-adrenoceptor function in major depression: Gi coupling, effects of imipramine and relationship to treatment outcome. *Psychiatry Res.* 1999; 89: 73-95.

69. Haeckel R, Colic D, Binder L, Oellerich M. Stimulation of glucose metabolism in human blood cells by inhibitors of carnitine-dependent fatty acid transport. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1990; 28: 329-333.
70. Halushka PV, Pawate S, Martin ML: Thromboxane A<sub>2</sub> and other eicosanoids, in *Handbook of Experimental Pharmacology, Platelets and Their Factors* (ed): Bruchhausen F, Walter U, vol 21, 1997, 459-482.
71. Hartwig JH, Italiano JE Jr. Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36: 99-103.
72. Hasegawa Y, Suehiro A, Higasa S, Namba M, Kakishita E. Enhancing effect of advanced glycation end products on serotonin-induced platelet aggregation in patients with diabetes mellitus. *Thromb Res.* 2002; 107: 319-323.
73. Haseruck N, Erl W, Pandey D, Tigyi G, Ohlmann P, Ravanat C, Gachet C, Siess W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood.* 2004; 103: 2585-2592.
74. Hechler B, Cattaneo M, Gachet C. The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost.* 2005; 31: 150-161.
75. Heijnen HF, Oorschot V, Sixma JJ, Slot JW, James DE. Thrombin stimulates glucose transport in human platelets via the translocation of the glucose transporter GLUT-3 from alpha-granules to the cell surface. *J Cell Biol.* 1997; 138: 323-330.
76. Hekimsoy Z, Payzin B, Ornek T, Kandogan G. Mean platelet volume in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2004; 18: 173-176.
77. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998; 391: 591-594.
78. Heptinstall S, Johnson A, Glenn JR, White AE. Adenine nucleotide metabolism in human blood – important roles for leukocytes and erythrocytes. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 :2331-2339.
79. Holinstat M, Voss B, Bilodeau ML, McLaughlin JN, Cleator J, Hamm HE. PAR4, but not PAR1, signals human platelet aggregation via Ca<sup>2+</sup> mobilization and synergistic P2Y12 receptor activation. *J Biol Chem.* 2006; 281: 26665-26674.
80. Holmsen H. Energy Metabolism and platelet responses. *Vox Sang.* 1981; 40: 1-7.
81. Holmsen H: Metabolism of platelets, in *Hematology* (ed): Williams WJ, Mc Craw-Hill Publishing Co, New York, 1990, 1200-1233.
82. Holmsen H. Biochemistry and function of platelets. In: Williams WJ. Ed. *Hematology* New York: McGraw-Hill, 1997, 1182-1243.
83. Hruz PW, Mueckler MM. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol.* 2001; 18: 183-193.
84. Iida N, Iida R, Takeyama N, Tanaka T. Related Articles, Increased platelet aggregation and fatty acid oxidation in diabetic rats. *Biochem Mol Biol Int.* 1993; 30: 177-185.
85. Illsley NP, Sellers MC, Wright RL. Glycaemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. *Placenta.* 1998; 19: 517-524.
86. Ishikura H, Takeyama N, Tanaka T. Effects of 2-tetradecylglycidic acid on rat platelet energy metabolism and aggregation. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1128: 193-198.



87. Iwase E, Tawata M, Aida K, Ozaki Y, Kume S, Satoh K, Qi R, Onaya T. A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in relation to complications in patients with type II diabetes mellitus. *Metabolism*. 1998; 47: 699-705.
88. Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, Kenche V, Anderson KE, Dopheide SM, Yuan Y, Sturgeon SA, Prabakaran H, Thompson PE, Smith GD, Shepherd PR, Daniele N, Kulkarni S, Abbott B, Saylik D, Jones C, Lu L, Giuliano S, Hughan SC, Angus JA, Robertson AD, Salem HH. PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*. 2005; 11: 507-514.
89. Jackson SP, Yap CL, Anderson KE. Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32: 387-392.
90. Jacobson KA, Mamedova L, Joshi BV, Besada P, Costanzi S. Molecular recognition at adenine nucleotide (P2) receptors in platelets. *Semin Thromb Hemost*. 2005; 31: 205-216.
91. Jarvis GE, Atkinson BT, Frampton J, Watson SP. Thrombin-induced conversion of fibrinogen to fibrin results in rapid platelet trapping which is not dependent on platelet activation or GPIb. *Br J Pharmacol*. 2003; 138: 574-83.
92. Kahn NN. Insulin-induced expression of prostacyclin receptors on platelets is mediated through ADP-ribosylation of Gi alpha protein. *Life Sci*. 1998; 63: 2031-2038.
93. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 2317-2326.
94. Kain K, Catto AJ, Young J, Bamford J, Bavington J, Grant PJ. Increased fibrinogen, von Willebrand factor and tissue plasminogen activator levels in insulin resistant South Asian patients with ischaemic stroke. *Atherosclerosis*. 2002; 163:371-376.
95. Karniguian A, Legrand YJ, Caen JP. Prostaglandins: specific inhibition of platelet adhesion to collagen and relationship with cAMP level. *Prostaglandins*. 1982; 23: 437-457.
96. Kauffenstein G, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1980-1988.
97. Keating FK, Whitaker DA, Sobel BE, Schneider DJ. Augmentation of inhibitory effects of glycoprotein IIb-IIIa antagonists in patients with diabetes. *Thromb Res*. 2004; 113: 27-34.
98. Khayat ZA, McCall AL, Klip A. Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased protein half-life. *Biochem J*. 1998; 333: 713-718.
99. Klein DJ, Cohen RM, Rymaszewski Z. Proteoglycan synthesis by bovine myocardial endothelial cells is increased by long-term exposure to high concentrations of glucose. *J Cell Physiol*. 1995; 165: 493-502.
100. Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Dean RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. Formation of modified and oxidized particles. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 3572-3582.
101. Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett*. 2001; 173: 83-91.

102. Kornberg A.: Lactic dehydrogenase in muscle. W *Methods in Enzymology* (red. Colowick S.P., Kaplan N.O.), Academic Press, New York, 1955, t.1, 441-442.
103. Kosaki G. In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int J Hematol.* 2005; 81: 208-219.
104. Kotelba-Witkowska B.: Skład chemiczny i procesy metaboliczne krwinek płytkowych. W: *Krwinki płytkowe* (red. Kotelba-Witkowska B.). PZWL, Warszawa, 1984, 33-54.
105. Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 1998; 82: 67-73.
106. Kroner C, Eybrechts K, Akkerman JW. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem.* 2000; 275: 27790-27798.
107. Kwaan HC. Changes in blood coagulation, platelet function, and plasminogen-plasmin system in diabetes. *Diabetes.* 1992; 41: 32-35.
108. Lambrecht G, Braun K, Damer M, Ganso M, Hildebrandt C, Ullmann H, Kassack MU, Nickel P. Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 2371-2399.
109. Lantoine F, Brunet A, Bedioui F, Devynck J, Devynck MA. Direct measurement of nitric oxide production in platelets: relationship with cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 215: 842-848.
110. Leon C, Vial C, Gachet C, Ohlmann P, Hechler B, Cazenave JP, Lecchi A, Cattaneo M. The P2Y1 receptor is normal in a patient presenting a severe deficiency of ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 775-781.
111. Leoncini G, Maresca M, Balestrero F, Polvani C, Armani U, Piana A. Platelet glucose metabolism in type I diabetic subjects. *Eur J Haematol.* 1987; 39: 166-171.
112. Leoncini G, Maresca M. Glucose and fructose utilization in human platelets. Effects of diamide. *Ital J Biochem.* 1984; 33: 221-229.
113. Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble CD40 ligand, soluble P-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation.* 2004; 109: 2524-2528.
114. Lipton SA i Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 1994; 330: 613-622.
115. Lowe PN, Perham RN. Bromopyruvate as an active-site-directed inhibitor of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1984; 23: 91-97.
116. Lunkes GI, Lunkes DS, Morsch VM, Mazzanti CM, Morsch AL, Miron VR, Schetinger MR. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced Diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004; 65: 1-6.
117. Makris PE, Tsakiris DA, Papadopoulos A, Ballas A. The ratio MDA/MDAa as a new index of platelet hyperactivity. *Haemostasis.* 1985; 15: 331-336.
118. Mangin P, Ohlmann P, Eckly A, Cazenave JP, Lanza F, Gachet C. The P2Y1 receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA2 formation is prevented. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 969-977.
119. Manley S. Haemoglobin A1c--a marker for complications of type 2 diabetes: the experience from the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1182-1190.
120. Mathur i Martin: Platelet heterogeneity: physiology and pathological consequences w *Platelets w Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed): Gresele i wsp. Cambridge University Press, Cambridge, 2002, 70-79.

121. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med.* 1995; 125: 370-377.
122. Michelson AD, Barnard MR. Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoproteins. *Prog Clin Biol Res.* 1988; 283: 159-162.
123. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991; 21: 361-374.
124. Morimoto T, Ogihara S. ATP is required in platelet serotonin exocytosis for protein phosphorylation and priming of secretory vesicles docked on the plasma membrane. *J Cell Sci.* 1996; 109: 113-118.
125. Motley ED, Kabir SM, Eguchi K, Hicks AL, Gardner CD, Reynolds CM, Frank GD, Eguchi S. Protein kinase C inhibits insulin-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001 Sep; 47: 1059-1062.
126. Negrescu EV, Sazonova LN, Baldenkov GN, Mukharliamov NM, Mazaev AV, Tkachuk VA. Relationship between the inhibition of receptor-induced increase in cytosolic free calcium concentration and the vasodilator effects of nitrates in patients with congestive heart failure. *Int J Cardiol.* 1990; 26: 175-84.
127. Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Jan; 14: 8-12.
128. Nie H, Wu JL, Zhang M, Xu J, Zou MH. Endothelial nitric oxide synthase-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in diabetes in vivo. *Diabetes.* 2006 Nov; 55(11):3133-41.
129. Niessner H, Beutler E. Fluorometric analysis of intermediates of the glycolytic and citric acid cycle pathway in human platelets. *Am J Clin Pathol.* 1974 Sep; 62: 361-366.
130. Niu X, Arthur P, Abas L, Whisson M, Guppy M. Carbohydrate metabolism in human platelets in a low glucose medium under aerobic conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1291: 97-106.
131. Noberasco G, Odetti P, Boeri D, Maiello M, Adezati L. *Biomed Pharmacother.* Malondialdehyde (MDA) level in diabetic subjects. Relationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin 1991; 45: 193-196.
132. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances Expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001; 158: 277-287.
133. Noordzij PG, Boersma E, Schreiner F, Kertai MD, Feringa HH, Dunkelgrun M, Bax JJ, Klein J, Poldermans D. Increased preoperative glucose levels are associated with perioperative mortality in patients undergoing noncardiac, nonvascular surgery. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156: 137-142.
134. Oury C, Toth-Zsomboki E, Thys C, Tytgat J, Vermeylen J, Hoylaerts MF. The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 1264-1271.
135. Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr.* 2006; 136: 3022-3026..

136. Panse M, Black H, Fuster W, Mest H. An improved malonyl dialdehyde assay for estimation of thromboxane synthetase activity in washed human blood platelets. *Prostaglandins* 1985; 30: 1031-1038.
137. Panzer S, Hocker L, Koren D. Agonists-induced platelet activation varies considerably in healthy male individuals: studies by flow cytometry. *Ann Hematol.* 2006; 85: 121-125.
138. Papanas N, Symeonidis G, Maltezos E, Mavridis G, Karavageli E, Vosnakidis T, Lakasas G. Mean platelet volume in patients with type 2 diabetes mellitus. *Platelets.* 2004;15: 475-478.
139. Park HS, Hourani SM. Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 1359-1366.
140. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005; 115: 3348-3354.
141. Hartwig JH, Italiano JE Jr. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood.* 2005; 106: 4076-4085.
142. Pawelczyk T, Angielski S. Cooperation of Ca and pH in regulation of the activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and its components from bovine kidney cortex. *Acta Biochim Pol* 1984; 3: 289-305.
143. Pearce J, Yates W, Berkhout A, et al.: The role of ATP citrate-lyase in the metabolic regulation of plasma lipids. *Biochem J* 1998; 334: 113-119.
144. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard . Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 128.
145. Pesce AJ, Kaplan LA, methods in Clinical Chemistry. The C.V. Mosby Company. Toronto, 1987.
146. Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14368-14375.
147. Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, Violi F. Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet function, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284: 41-48.
148. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Ciatti F, Pesciotti M, Sebastiani S, Ferroni P, Gazzaniga PP. Acid citrate dextrose (ACD) formula A as a new anticoagulant in the measurement of in vitro platelet aggregation. *J Clin Lab Anal.* 1995; 9: 138-140.
149. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood.* 1998 Jan 15; 9: 484-490.
150. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J.* 1997; 16: 2333-2341.
151. Pyorala K, Hoffman R, Hanrath P. Type 2 diabetic subjects without prior myocardial infarction are at the same risk of coronary events as non-diabetic subjects with prior myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1999; 20: 473-475.
152. Radomski MW, Moncada S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 344: 251-264.
153. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12:87-88.

154. Radomski MW, Zakar T, Salas E. Nitric oxide in platelets. *Methods Enzymol.* 1996; 269: 88-107.
155. Rahbar AR, Shakerhosseini R, Saadat N, Taleban F, Pordal A, Gollestan B. Effect of L-carnitine on plasma glycemc and lipidemic profile in patients with type II diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 59: 592-596.
156. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-492.
157. Raman P, Krukovets I, Marinic TE, Bornstein P, Stenina OI. Glycosylation mediates upregulation of a potent antiangiogenic and proatherogenic protein, Thrombospondin-1, by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2006; w duku.
158. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1546: 21-43.
159. Ravandi A, Kuksis A, Shaikh NA. Glucosylate glycerophosphoethanolamines are the major LDL glycation products and increase LDL susceptibility to oxidation: evidence of their presence in atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 467-477.
160. Redondo PC, Jardin I, Hernandez-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. TOR blockade inhibits shear-induced platelet phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 639-645.
161. Resendiz JC, Feng S, Ji G, Francis KA, Berndt MC, Kroll MH. Purinergic P2Y<sub>12</sub> receptor mediates glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. Formation of modified and oxidized particles. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 3572-3582.
162. Rigny J, Tucek S, Novakova J. Acetylcarnitine, carnitine and glucose diminish the effect of muscarinic antagonist quinuclidinyl benzilate on striatal acetylcholine content. *Brain Res.* 1992; 576: 215-219.
163. Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X<sub>1</sub> purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 303-308.
164. Rosado JA, Sage SO. The ERK cascade, a new pathway involved in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12: 229-234.
165. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIIb/IIIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood.* 1994; 83:1244-1250.
166. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414: 799-806.
167. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature.* 2001; 413: 74-78.
168. Sanchez A. Ca<sup>2+</sup>-independent secretion is dependent on cytoplasmic ATP in human platelets. *FEBS Lett* 1985, 191: 283-286.
169. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1178: 153-175.
170. Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, Cipolloni PB, Mecocci P, Kowall NW, Rosen BR, et al. Blockade of neuronal

nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci.* 1995; 15: 8419-8429.

171. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985; 260: 11107-11114.

172. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1142-1147.

173. Shoji T, Koyama H, Fukumoto S, Maeno T, Yokoyama H, Shinohara K, Emoto M, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y. Platelet-monocyte aggregates are independently associated with occurrence of carotid plaques in type 2 diabetic patients. *J Atheroscler Thromb.* 2005; 12: 344-52.

174. Skibowska A, Raszeja-Specht A, Szutowicz A. Platelet function and acetyl-coenzyme A metabolism in type 1 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41: 1136-1143.

175. Skibowska A, Zaburzenia funkcji i metabolizmu acetylo-CoA krwinek płytkowych w cukrzycy. Rozprawa doktorska (AMG); Gdańsk, 2000.

176. Sogo N, Magid KS, Shaw CA, Webb DJ, Megson IL. Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: relative contribution of cGMP-independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279: 412-419.

177. Sorbara LR, Davies-Hill TM, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Horne MK, Simpson IA. Thrombin-induced translocation of GLUT3 glucose transporters in human platelets. *Biochem J.* 1997; 328: 511-516.

178. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia.* 2004; 47: 1727-1734.

179. Stafford NP, Pink AE, White AE, Glenn JR, Frelin C. Mechanism involved in adenosine triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1928-1933.

180. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985; 101: 880-886.

181. Strosznajder JB, Jesko H, Strosznajder RP. 2004. Fosfolipidy inozytowe w procesie przekazywania sygnału. W: Nowak JZ, Zawilska JB (Ed.), Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału, vol 5, s. 90-105, PWN 2004.

182. Stuart CA, Wen G, Williamson ME, Jiang J, Gilkison CR, Blackwell SJ, Nagamani M, Ferrando AA. Altered GLUT1 and GLUT3 gene expression and subcellular redistribution of GLUT4: protein in muscle from patients with acanthosis nigricans and severe insulin resistance. *Metabolism.* 2001; 50: 771-777.

183. Szabo C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.* 1995; 3: 2-32.

184. Szutowicz A, Angielski S. Regulation of ATP citrate lyase activity in vitro. *Acta Biochim Pol.* 1970; 17: 159-174.

185. Szutowicz A, Stepień M, Piec G. Determination of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase activities using citrate synthase. *Anal Biochem.* 1981; 115: 81-87.

186. Szutowicz A, Bielarczyk H. Elimination of CoASH interference from

- acetyl-CoA cycling assay by maleic anhydride. *Anal Biochem.* 1987; 164: 292-296.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Zieliński P, Pawelczyk T, Tomaszewicz M. Nerve growth factor and acetyl-L-carnitine evoked shifts in acetyl-CoA and cholinergic SN56 cell vulnerability to neurotoxic inputs. *J Neurosci Res.* 2005; 79:185-192.
188. Tablin F, Castro M, Leven RM. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J Cell Sci.* 1990; 97: 59-70.
189. Tan KT, Tayebjee MH, Lim HS, Lip GY. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. *Diabet Med.* 2005; 22: 1657-1662.
190. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411: 437-455.
191. Tomasiak M, Stelmach H, Rusak T, Wysocka J. Nitric oxide and platelet energy metabolism. *Acta Biochim Pol.* 2004; 51: 789-803.
192. Triggiani M, Oriente A, Golino P, Gentile M, Battaglia C, Brevetti G, Marone G. Inhibition of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils and platelets by propionyl-L-carnitine. *Biochem Pharmacol.* 1999; 58: 1341-1348.
193. Utzschneider KM, Kahn SE. Related Articles, Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 4753-4761.
194. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 535-602.
195. Veeger C, Der Vartanian, DV, Zeylemeker WP, 1969. Succinate dehydrogenase. W: Lowenstein JM. (Ed.), *Methods in Enzymol*, vol.13, 106-116.
196. Verhoeven AJ, Mommersteeg ME, Akkerman JW. Kinetics of energy consumption in human platelets with blocked ATP regeneration. *Int J Biochem.* 1986;18: 985-90.
197. Vericel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decreased antioxidant status. *Diabetes* 2004; 53: 1046-1051.
198. Vial C, Rolf MG, Mahaut-Smith MP, Evans RJ. A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br J Pharmacol.* 2002; 135: 363-372.
199. Watała C. May the alterations in lipid fluidity-mediated platelet hypersensitivity contribute to accelerated aging of platelets in diabetes mellitus? *Med Hypotheses.* 1991; 36: 142-145.
200. Watała C, Gwozdziński K, Pluskota E, Pietrucha T, Walkowiak B, Trojanowski Z, Cierniewski CS. Diabetes mellitus alters the effect of peptide and protein ligands on membrane fluidity of blood platelets. *Thromb Haemost.* 1996; 75: 147-153.
201. Watała C, Boncer M, Golanski J, Koziolkiewicz W, Trojanowski Z, Walkowiak B. Platelet membrane lipid fluidity and intraplatelet calcium mobilization in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Haematol.* 1998; 61: 319-326.
202. Watling KJ: P<sub>2</sub> receptors. In the *Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction*. Watling KJ, Ed. Natick, MA, Sigma-RBI, 2001, 64-67.
203. Watson SP, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R, Jarvis G, Marshall S, Snell D, Stafford M, Tulasne D, Wilde J, Wonerow P, Frampton J. The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by

- collagen. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 276-288.
204. Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today.* 1998; 19:260-264.
205. Weiss EJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Grigoryev D, Jin Y, Kickler TS, Bray PF. A monoclonal antibody (SZ21) specific for platelet GPIIIa distinguishes P1A1 from P1A2. *Tissue Antigens.* 1995; 46: 374-381.
206. White: Morphology and ultrastructure of platelets in *Platelets w Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed): Gresele i wsp. Cambridge University Press, Cambridge, 2002, 41-69.
207. Willoughby SR, Chirkov YY, Kennedy JA, Murphy GA, Chirkova LP, Horowitz JD. Inhibition of long-chain fatty acid metabolism does not affect platelet aggregation responses. *Eur J Pharmacol.* 1998; 356: 207-213.
208. Winocour PH, Mitchell WS, Gush RJ, Taylor LJ, Baker RD. Altered hand skin blood flow in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1988; 5: 861-866.
209. Winocour PD. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1992; 41: 26-31
210. Winocour PD, Platelet turnover in advanced diabetes. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24: 34-37.
211. Wirthumer-Hoche C, Silberbauer K, Sinzinger H. Effect on nitroglycerin and other organic nitrates on the in-vitro biosynthesis of arachidonic acid-metabolites in washed human platelets. *Prostaglandins Leukot Med.* 1984;15: 317-323.
212. Wright JA, Maeba P, Sanwall BD. Allosteric regulation of the activity of citrate synthase of *Escherichia coli* by  $\alpha$ -ketoglutarate. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 29: 34-40.
213. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained Effect of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus on Development and Progression of Diabetic Nephropathy *JAMA.* 2003; 290: 2159-2167.
214. Zappacosta B, De Sole P, Rossi C, Marra G, Ghirlanda G, Giardina B. Lactate dehydrogenase activity of platelets in diabetes mellitus. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995; 33: 487-489.
215. Zeevalk GD, Derr-Yellin E, Nicklas WJ. Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 275:1124-1130.
216. Zeijlemaker WP, Dervartanian DV, Veeger C, Slater EC. Studies on succinate dehydrogenase. IV. Kinetics of the overall reaction catalysed by preparations of the purified enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1969; 178: 213-224.
217. Zozulinska M, Zawilska K. Evaluation of platelet malondialdehyde and 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid in type I and II diabetic patients with ketoacidosis and after clinical complications. *Pol Arch Med Wewn.* 1991; 85: 286-293.





