

TROMBOSİT AKTİVASYONU

Gülriz Ersöz*

ÖZET

Trombositlerin başlıca işlevi hemostazisin sağlanmasıdır. Damar duvarının zedelenmesini takip eden milisaniyeler içinde trombositler, açığa çıkan subendotelyal kollajene adhere olurlar. Adezyon ve birçok fizyolojik agonist hücreyi aktive ederek bir seri reaksiyonu tetikler.

Trombosit agonistleri, membran üzerinde spesifik reseptörlerine bağlanarak trombositleri uyarırlar. Agonist-reseptör kompleksinin aktive ettiği G proteinler ile sinyal membran boyunca iletilir. Fosfoditil inositlerin (IP) fosfolipaz C (PLC) enzimi ile hidrolize ve fosfolipaz A₂(PLA₂) ile araşidonik asit serbestleşmesi, trombositlerin aktivasyonunda rol oynayan önemli hücre içi yollardır. Ayrıca, son yıllarda çeşitli agonistlerin trombositlerde protein tirozin kinaz aktivitesini artırdığını gösterilmiştir. Siklik adenzin monofosfat (c-AMP) ve siklik guanidin monofosfat (c-GMP) trombosit fonksiyonlarını baskılamaktır.

ADP, trombin, kollajen, epinefrin, trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi önemli fizyolojik agonistler kısmen farklı yolları kullanarak trombositleri aktivite etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Trombosit, Trombosit Aktivasyonu, Trombosit Agonistleri

SUMMARY

Platelet Activation

The essential function of the platelets is the maintenance of haemostatis. They form a plug in milliseconds following the vascular injury. Adhesion and several physiologic agonists activate and trigger series of reactions.

Platelet agonists bind to their special receptors on the membrane and induce the cell. Signal conducts through the membrane by G proteins, activated by agonist-receptor complex. Hydrolyses of phosphatidylinositids (IP) by phospholipase C (PLC) and release of arachidonic acid by phospholipase A₂ (PLA₂) are the main activation intracellular pathways of the platelets. Recently it is found that several agonists increase tyrosine kinase activation in platelets. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanidine monophosphate inhibit platelet function.

Several Physiological agonists, adenosine diphosphate (ADP), thrombin, collagen, epinephrine, platelet activating factor (PAF) activate platelets by using partially different pathways.

Key Words: Platelet, Platelet activation, Platelet agonists

Trombositlerin başlıca işlevi hemostazisin sağlanmasıdır. Damar duvarının zedelenmesi ile hasar bölgesinde tıkaç oluştururlar. Hasarı takip eden milisaniyeler içinde trombositler, damar bütünlüğünün bozulması ve endotel tabakasının zedelenmesi ile açığa çıkan subendotelyal kollajene adhere olurlar. Hücrenin kollajene adezyonu von Willebrand faktör (vWF) aracılığı ile gerçekleşir. vWF, kollajen ve trombosit membranında bulunan spesifik reseptörlerine bağlanarak ikisi arasında köprü oluşturur. Adezyon hücreyi aktive ederek bir seri reaksiyonu tetikler. Bir çok fizyolojik agonist ; kollajen, laminin, fibronektin gibi matris komponentleri, epinefrin, vazopressin gibi hormonlar, trombin gibi hasar sırasında oluşan maddeler,

aktif trombositlerden salınan tromboksan A₂ (TxA₂), adenzin difosfat (ADP) bu reaksiyonları başlatır. Aktif trombositler diskoid formdan sferik forma dönüşürler ve hücre yüzeyinde filopotlar oluşur. Membran yüzeyindeki fibrinojen reseptörü fibrinojenin bağlanmasına uygun hale gelir. Trombositler birbirlerine fibrinojen köprüleri ile bağlanarak agrege olurlar. Bu aşamada trombosit agregasyonu reversibldir ve primer agregasyon adını alır. Trombositlerde granül sekresyonu ve membranda serbestleşen araşidonik asitten TxA₂ oluşması ile trombosit agregasyonu irreversible hale gelir. Trombositlerin içerdiği üç farklı tip granül içeriği uyaran şiddetine bağlı olarak salınırlar (a granüller, yoğun cisimcikler < lizozomlar). Sekresyon, kontraktıl ele-

* A.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi

manların granülleri hücrenin santraline itmeleri ile başlar. Santralde toplanan granüllerin membran bağlantılı kanal sistemine veya doğrudan membrana füzyonu ile granül içerikleri hücre dışına bırakılır (1,2,3,4,5,6).

Trombosit agonistleri, trombosit membranından penetre olamaz. Membran yüzeyinde uygun bölgelere bağlanarak trombositleri uyarırlar. Agonist-reseptör kompleksinin aktive ettiği guanidintrifosfat (GTP) bağımlı regülatuar proteinler (G proteinler) ile sinyal membran boyunca iletilir. G proteinler, hücre içi ikincil habercilerin oluşumunda rol oynayan bazı enzimlerin aktivasyonuna yol açar. Trombositlerin aktivasyonunda iki hücre içi yol önemli rol oynar:

1-Fosfotidil inositolün (IP) fosfolipaz C (PLC) enzimi ile inositol trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserole (DAG) hidrolizi. IP₃ sitozolik Ca²⁺ düzeyini artırırken, DAG, protein kinaz C' (PKC) aktive ederek bazı spesifik proteinlerin fosforilasyonuna yol açar.

2- Membran fosfolipitlerinden fosfolipaz A₂ (PLA₂) ile araşidonik asit serbestleşmesi ve TxA₂ oluşumu. TxA₂ trombosit membranı üzerindeki reseptörüne bağlanarak trombosit aktivasyonuna yol açar (4,5,6,7,8,9).

Hücrede yer alan diğer ikincil haberciler siklik adenozin monofosfat (c-AMP) ve siklik guanidin monofosfat (c-GMP), trombosit fonksiyonlarını baskırlar (6,10,11).

G PROTEİNLER

G proteinler, hücrede reseptör ile ikinci habercilerin oluşumuna yol açan enzim arasında etkileşimi sağlar. Bu proteinler tarafından regüle edilen enzimler arasında PLC, PLA₂, adenil siklaz, c-GMP fosfodiesteraz sayılabilir. Ayrıca Na, K, Ca iyon kanallarının aktiviteyi de G proteinler tarafından düzenlenebilmektedir (12,13,14).

G proteinler heterotrimerik, guanin nükleotid bağlayan proteinlerdir. Ga, Gβ ve Gγ alt ünitelerine sahiptirler. Ga alt ünitesi guanin nükleotid bağlayan kısımdır ve reseptör ile efektör (enzim) arasındaki bağlantıyı sağlar. Onbeşten fazla farklı Ga tanımlanmış ve Gsa, Gia, Gta, Gza şeklinde sınıflandırılmıştır. her grupta iki veya daha fazla varyant vardır. Gβ ve Gγ sıkıca bağlanarak hidrofobik bir dimer oluştururlar. Gβγ kompleksinin Ga'nın membrana tutunmasını sağladığı ve fonksiyonunu düzenlediği, PLA₂'yi direkt olarak uyardığı, Ca iyonunun kalmoduline (CaM) bağlanmasında rol oynadığı öne sürülmektedir. Gβ'nin üç, Gγ'nin dört bilinen varyantı vardır (12,14,15).

Reseptör aktive olunca, Ga üzerindeki guanidin difosfat (GDP), GTP ile yer değiştirir. Ga Gβγ kompleksinden ayrılır. GTP taşıyan serbest Ga efektör

enzimi aktive eder. GTP intrinsek GTPaz aktivitesi ile GDP'ye yıkılır. GDP taşıyan Ga, Gβγ kompleksi ile birleşir (9,14).

İki bakteriyel toksin G proteinlerinin fonksiyonlarını etkiler. Kolera toksini Gsa üzerindeki arjininin ADP ribozilasyonuna yol açarak GTP hidrolizini inhibe eder ve a alt ünitesi aktif durumda stabilize eder (12,16). Pertusis toksini Gia ailesini de içine alan bir grup a alt ünitesinin sinyal iletimini bloke eder (12,17).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, trombositlerde sinyal iletiminin erken evrelerinde yer alan G proteinlere ilişkin ayrıntılı bilgi sağlamıştır. Bugüne kadar trombositlerde dokuz ayrı G protein tanımlanmıştır (13). Trombositlerde G proteinlerin hedefleri adenil siklaz, PLA₂, PLC enzimleridir. Gs ve Gi aileleri adenil siklaz yolu ile c-AMP oluşumunu düzenlerler. Bazı araştırmacılar PLC aktivasyonunda rol oynayan Gp alt grubu tanımlamaktadır. Trombositlerin pertusis toksinine duyarlı Gp formu taşıdığı öne sürülmektedir. Ayrıca trombositlerde PLC aktivasyonunda rol oynayan, pertusis toksinine duyarlı olmayan bir başka G proteinini tanımlanmaktadır. Son araştırmalar birbirleri ile yakın bağıntılı olduğu gösterilen Gq ve G11q olarak tanımlanan proteinlerin varlığını göstermiştir. Bunların aktivasyonunda PI hidrolizinin hızlandığı saptanmıştır. Trombositlerde Gq'nun varlığı gösterilmiş ve TxA₂'nin uyardığı PLC aktivasyonundan sorumlu olduğu öne sürülmüştür. Trombositlerde Gz'nin rolü ise aydınlatılmamıştır. Trombositler, fosfotidil inositol 3,5 difosfat (PIP₂) hidrolizi ile PKC'yi aktive eden trombin ve TxA₂ analogları ya da PKC'yi direkt aktive eden forbol esterleri ile uyarıldığında Gz fosforile olur (12,14). PLA₂ aktivasyonunda trombositlerde iki farklı mekanizmanın varlığı gösterilmiştir: 1-Gp veya Gq bağımlı PI hidrolizi sonucu hücre içi Ca düzeyinin artışı ile indirekt aktivasyon, 2- G proteinleri ile direkt aktivasyon (12).

Trombositler ayrıca klasik G proteinlerinin a alt ünitesinden küçük GTP bağlayan bir protein taşırlar. Fonksiyonu konusunda fazla bilgi olmamakla birlikte çeşitli onkojenler ile homolog olduğu gösterilmiştir (9,10,13).

PLC VE IP HİDROLİZİ

Bir çok hücrede olduğu gibi trombositlerde de uyarı, inositol fosfolipitlerin hidrolizine yol açar. İnositol fosfolipitler, 1-steroil 2-araşidonil-gliserol temel yapısında bileşiklerdir. Üç anyonik fosfolipit baş kısımlarında miyo-inositol içerirler. En yaygın formu fosfotidil inositoldür (PI) (18,19,20).

İnsan trombositte 17-20nmol/10⁹ hücre PI ve 3nmol fosfotidilinositol difosfat (PIP₂) içerir. Bu miktarlar total trombosit fosfolipidinin %5-7'sini oluşturur

(9). Hücre zarı, 4. ve 5. pozisyonadaki hidroksilin fosforilasyonunu sağlayan PI-4P ve PI-5P kinaz taşır. Fosfomono esterazlar ise 4 ve 5. pozisyonadaki fosfatları uzaklaştırır (18,19).

Agonistin reseptörüne bağlanması PIP₂'nin iki hücre içi haberciye; IP₃ ve DAG' hidrolizini indükler. PIP₂'nin hidrolizi PLC tarafından katalizlenir (1,9,18,21). PLC aktivitesi G proteinler tarafından regüle edilir (10,21).

Trombositlerde PLC membranda ve sitozolde bulunur (1,9,18). Üç farklı sitozolik PLC formu olduğu saptanmıştır. Bu formlar arasında aktiviteleri bakımından fark bulunamamıştır (9). PLC'nin PIP₂ 'ye affinitesi, dinlenme durumundaki hücre içi Ca²⁺ düzeylerinde daha yüksektir (9).

PIP₂'in hidrolizi açığa çıkan DAG'ün fosfotidik asite (PA) fosforilasyonunu PI sentezi izler. PI'ın fosforilasyonu ile PIP ve PIP₂ yeniden sentezlenir (1,22).

IP₃

İnsan trombositlerinde IP₃ oluşumu çok hızlıdır. IP₃ oluşumu G protein bağımlı reseptörler ve tirozin kinaza direkt veya indirekt bağımlı reseptörler ile tetiklenen iki yolla gerçekleşir. Oluşan IP₃ hızlı metabolitlerine yıkılır (9,21).

IP₃, trombositlerde dens tubuler sistemden (DTS) Ca²⁺ mobilizasyonunu sağlar. DTS, üzerinde IP₃ bağlanma bölgeleri içerir. IP₃'ün DTS'e bağlanması ile reseptörle yakın bağlantısı olan Ca²⁺ kanalları açılır (20,23,24,25). Kanalin açılması için en az üç molekül IP₃ bağlanması gerektiği ileri sürülmektedir (20). Meyer ve çalışma arkadaşları (21) tarafından, kanalın açılmasının tetramerik yapıdaki reseptörün dört olası bağlanma bölgesine bağlanan IP₃ sayısına bağlı olduğunu, her bağlanmanın kanalda kısmi açılmaya yol açtığını bildirilmektedir.

Ca²⁺'un, DTS boyunca sürekli döndüğü, IP₃'ün Ca²⁺'un ER'dan pasif çıkışını uyarırken ATP bağımlı girişi etkilemediği gösterilmiştir. Ayrıca IP₃ bağımlı Ca²⁺ salınımında K⁺ varlığının da gerekli olduğu saptanmıştır. IP₃'ün hücre dışından Ca²⁺ girişinde de potansiyel rolü olduğu da vurgulanmaktadır (20).

Ca²⁺

Trombositler Ca²⁺ ile regüle edilen uyarılabilir hücreler olarak tanımlanırlar. Hücre içi ve dışı Ca²⁺ konsantrasyonu trombosit aktivasyonu bakımından önem taşır.

Dinlenme durumunda ve aktif trombositlerden serbest ve depo Ca düzeyleri ve Ca akımları çeşitli yöntemler ile ölçülebilir. Klortetrasiklin, biyolojik membranları geçerek divalant katyonlarla flouresan kompleks oluşturur. Kompleks membrana yakın böl-

gelerde yüksek flouresan verirken membrandan ayrıldığında flouresan azalır. Bu madde, membrana bağlı Ca'un değerlendirilmesi amacı ile kullanılır. Sitozolik Ca düzeylerinin ölçümünde sıklıkla, Quin-2, Fura-2, İndo-1 gibi flouresan indikatörler kullanılır. Ayrıca Aequarin gibi Ca²⁺'a duyarlı fotoproteinlerin luminesansı ölçülerek de sitozolik Ca ölçülebilir (26).

Trombositlerde bazal sitozolik Ca²⁺ düzeyi ortalama 100 nmol'dür. Dinlenme durumunda hücre içi Ca²⁺ dengesi, hücre dışından Ca²⁺ girişinin sınırlandırılması, hücre dışına aktif olarak pompalanması ve Ca²⁺'un başlıca DTS'de olmak üzere dens granüller, mitokondride depolanması ile korunur. Hücre membranının iç yüzeyinde de Ca²⁺ bağlanma bölgeleri yer almaktadır (27,28,29). Hücre dışına aktif Ca²⁺ çıkışı Ca²⁺ ATPaz aktivitesi ile sağlanır. Hücre içi membranlarda ise Ca²⁺Mg²⁺ATPaz aktivitesi ile taşınır (9,26). Yoğun granüllerde yer alan Ca²⁺ egzozitoz ile hücrelerarası sıvıya salınır. DTS ve hücre membranından trombosit aktivasyonu sırasında sitoplazmaya Ca²⁺ salınır. Bu süreçte mitokondrinin yer almadığı vurgulanmaktadır (9,21,28).

Hücre içi Ca²⁺'un en önemli regülatörü c-AMP'dir. c-AMP, Ca²⁺ -Mg²⁺ ATPaz ile sitozolik Ca iyonunu DTS'e taşır. Ayrıca PIP₂ hidrolizini de inhibe ettiği bilinmektedir. c-GMP artışı da PIP₂ hidrolizini inhibe ederek Ca²⁺ artışını baskılar (11,28,29).

Ca²⁺, trombosit fonksiyonlarının gerçekleşmesinde temel rol oynar. Trombositlerde, şekil değişikliği, agregasyon, granül içeriklerinin salınımı gibi çeşitli fonksiyonlar için minimum Ca eşiği olduğu gösterilmiştir (30-33). Trombositler agonistler tarafından uyarıldığında, hücre içi depolardan salınan ve hücre dışından hücre içine alınan kalsiyum ile sitozolik kalsiyum konsantrasyonu artar (26,27).

PIP₂'in %10'unun PLC ile hidrolizi sitozolik Ca²⁺ düzeyinde artışa yol açar (9). Yukarıda belirtildiği gibi, IP₃, DTS üzerinde reseptörüne bağlanarak Ca²⁺ salınımını tetikler.

Hücre içine kalsiyum girişinde rol oynayan mekanizmalar halen araştırılmaktadır. Trombositlerde reseptör kapılı kalsiyum kanallarının çeşitli tipleri gösterilmiştir (27). Hücre içine kalsiyum iyonu girişinde hücre içi depolar tarafından yönlendirilen "kapasitan" Ca²⁺ girişi modeli öne sürülmektedir. Bu modelde hücre içi depolarda kalsiyum iyon konsantrasyonunun azalması hücre membranında yer alan Ca²⁺ kanallarını açmaktadır (34). Hücre içi depoların yüzeyinde bulunan IP₃ reseptörünün, plazma membranında bulunan bir başka protein ile temasta olduğu ve bu proteinin inositol 1,3,4,5 tetrafosfat (IP₄) için reseptör olarak fonksiyonu gördüğü öne sürülmüştür. Bu iki reseptör proteini disosiyasyonunda kalsiyum girişi başlatmaktadır. İki proteinin disosiyasyonu IP₃ veya IP₄

reseptörlerine bağlandıklarında ve hücre içi depolarda Ca^{2+} azaldığında gerçekleşir (28,35).

Trombin ile indüklenen sitozolik Ca^{2+} artışının protein fosfataz1 ve 2A inhibitörleri tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Protein fosfataz1'in reseptör kapılı Ca^{2+} kanallarının regülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (36).

Hücre içinde bir çok proteinin fonksiyonu, direkt Ca^{2+} veya Ca/CaM kompleksi tarafından düzenlenmektedir. Kalsiyum iyonoforlar membrandan geçerek doğrudan hücre içi depolardan Ca^{2+} 'u mobilize eder. Kalsiyum iyonoforların kullanılması ile PLA_2 aktive olur, PLC'nin aktivitesi artar (26,29).

Trombosit aktivasyonuna hücre iskeleti organizasyonunda değişiklikler eşlik eder. Trombosit iskeletinin aktin filamentlerinin oluşturduğu iki komponenti bulunur. Bunlardan biri sitoplazmayı dolduran ve kontraktiliteden sorumlu sitoplazmik aktin filamentleri, diğeri ise membranın iç yüzünü kaplayan ve membran stabilitesini regüle eden membran iskeletidir. Trombositler aktive olduklarında hücre iskeletinde önemli değişiklikler meydana gelir. Aktin polimerizasyonu hızlanır, oluşan yeni filamentler filopotların içini doldurur. Gövdede bulunan filamentler ise miyozine bağlanır. Bu bağlanma sekreteruar granüllerin santralizasyonu ve pıhtı retraksiyonu için gerekli gerimi sağlar. Bu organizasyon, aktin bağlayan protein, a aktinin, gelsolin, p235 gibi bir çok aksesuar proteinin Ca^{2+} bağımlı etkileşimleri ile gerçekleşir. Yeni filamentlerin %70-80'i Ca^{2+} bağımlı mekanizmalar ile oluşur. Aktomyozinin kontraktil aktivitesi Ca/CaM bağımlı miyozin hafif zincir kinazın (MLCK) miyozini fosforilasyonu ile regüle edilir (37-39).

Trombosit agregasyonu ekstraselüler divalant kanyonlara bağımlıdır. Fibrinojenin reseptörüne bağlanması için Ca^{2+} veya Mg^{2+} gerekmektedir. Hücre dışı Ca^{2+} , yüzeye bağlı Ca^{2+} ile denge içindedir. Hücre zarında bulunan glikoprotein IIb/IIIa kompleksi (GPIIb/IIIa) üzerinde Ca^{2+} için yüksek affiniteli bağlanma bölgelerine bağlanan Ca^{2+} , fibrinojenin bu glikoproteine bağlanması için uygun ortam oluşturur. Sitozolik Ca^{2+} 'un fibrinojenin bağlanmasındaki rolü açık değildir (40,41).

DAG

PIP_2 hidrolizi ile açığa çıkan diğer ikincil haberci DAG'dür. Trombin ile uyarılan trombositlerde DAG düzeyinin hızla yükseldiği ve 20s içinde pik oluşturarak hızla azaldığı bildirilmiştir (19). Ancak DAG'ün trombin ile uyarılan trombositlerde bifazik artış gösterdiği sonucuna ulaşan araştırma sonuçları da vardır. DAG artışında ilk fazın hızlı ve geçici olduğu, IP_3 oluşumu ile paralellik gösterdiği, ikinci ve kalıcı fazın ise

IP_3 oluşumundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (41). Werner ve arkadaşları(42) ise trombin ve kollajen ile uyarılan trombositlerde gecikmiş ve kalıcı DAG birikimi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Trombin ile geçici erken bir yükselme olduğu, daha geç evrede yoğun bir DAG birikimi olduğunu göstermişlerdir. İlk faz sekonder agregasyonun oluşması için yetersiz kalmaktadır. İkinci faz granül sekresyonu ve sekonder agregasyon ile bağlantılıdır. Kollajen ile ilk fazın oluşmadığı saptanmıştır.

Aynı grup gerçekleştirdikleri bir dizi çalışmanın ve diğer araştırmacıların çalışmalarının sonuçlarını birleştirerek trombositler için bir aktivasyon modeli öne sürmüşlerdir:

Agonistin bağlanması trombositlerde PLC'yi aktive eder. PLC, PIP_2 'ı IP_3 ve DAG'e hidrolize eder. IP_3 , hücre içi kaynaklardan sitoplazmaya hızlı bir Ca^{2+} salınımına yol açar. Hücre içi Ca^{2+} düzeyinde artış Ca/CaM bağımlı kinazların aktivasyonu (örn. MLCK) ile trombositlerde şekil değişikliğine yol açar. PLC aktivasyonu ile oluşan DAG başlangıçta granül sekresyonu ve sekonder agregasyonun indüklenmesi için yeterli değildir. PLA_2 /araşidonik asit yolunun (G proteini veya artmış Ca^{2+} yolu ile) aktivasyonu ile TxA_2 oluşur. TxA_2 , reseptörüne bağlanarak PLC'yi aktive eder. Bu fazda daha fazla artış gösteren DAG, PKC'yi uyarır. PKC'nin bazı spesifik proteinleri fosforile etmesi ile aktivasyon tamamlanır ve sekresyon ile sekonder agregasyon gerçekleşir (43).

PKC

DAG, bazı spesifik proteinlerin fosforilasyonunu katalizleyen PKC'i aktive eder. PKC, çeşitli dokularda yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Trombositlerde ve beyin hücrelerinde yüksek aktiviteye sahiptir. Trombositlerde inaktif solubl formda bulunur. Aktivasyonu için Ca^{2+} 'a gereksinim vardır. DAG, enzimin Ca^{2+} 'a affinitesini artırarak, Ca^{2+} konsantrasyonunda artış olmadan enzimin aktivasyonunu sağlar. DAG yokluğunda, 100 kat yüksek Ca^{2+} konsantrasyonu gerekmektedir. Düşük konsantrasyonda Ca^{2+} içeren ortamlarda enzimin aktivasyonu için fosfotidil serin gereklidir. Aktif PKC; fosfolipit, Ca^{2+} , DAG ve enzimden oluşan dördü bir kompleks olarak kabul edilmektedir. Diğer fosfolipitlerin de (fosfotidil etanolamin, fosfotidil kolin, sfingomiyelin gibi) PKC aktivasyonunda pozitif ya da negatif yönde etkilerinin olduğu gösterilmiştir (18,20).

Aktif PKC bazı spesifik proteinlerin fosforilasyonu ile çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar. Çeşitli dokularda gerçekleştirilen çalışmalar 18 endojen protein veya enzim ile 8 reseptörün PKC substratı olduğunu göstermiştir. Trombositlerde 40kDa, 47kDa ve 20kDa proteinlerin PKC için spesifik substratlar olduğu gösterilmiştir.

rilmiştir (9,20). Majerus ve çalışma arkadaşları (44) 40kDa proteinin IP₃ monoesteraz olabileceğini belirtmiştir. Bu proteinin PKC tarafından fosforilasyonu IP₃ düzeyinin düzenlenmesi bakımından önem taşımaktadır. 20kDa proteinin MLCK olduğu kabul edilmektedir (18).

PKC aktivasyonu hücrede fizyolojik yanıtları başlatmak için gerekli ancak yeterli değildir. PKC aktivasyonu ve Ca²⁺ mobilizasyonunun selektif ve birbirinden bağımsız olarak uyarılabildiği gösterilmiştir. Hücre zarından geçebilen DAG ortama konduğunda PKC aktive olurken, A23187 gibi Ca iyonoforları ile hücre içi Ca²⁺ düzeyi artar. Ancak Ca iyonoforların DAG yanıtı artırdığı gösterilmiştir. Araştırma sonuçları PKC yolunun bağımsız ancak hücre içi Ca²⁺ düzeyi artışı ile sinerjistik olduğunu göstermektedir (19,24,45).

Ca²⁺ mobilizasyonu sonrası Ca²⁺'un uzaklaştırılmasında PKC'nin rolü olduğu öne sürülmektedir. Ca²⁺ ATPaz PKC için olası bir substrattır (24).

PLA₂

PLA₂, fosfolipitlerden araşidonik asit salınımında rol oynayan membran bağımlı bir enzimdir (46). PLA₂'nin Ca²⁺'a affinitesinin PLC'den daha az olduğu saptanmıştır. PLA₂'nin fosfolipitler üzerine etkisi, ancak sitozolik Ca²⁺ düzeyi artışı ile başlar (20). Trombositlerde araşidonik asit salınımında G proteinlerin rolü olduğu, GTP ve GTPgS'nin araşidonik asit salınımına yol açtığı gösterilmiştir (17,20).

PLA₂'nin özellikle trombositlerin epinefrin ile aktivasyonunda önemli rolü olduğu bilinmektedir (12,17). PLA₂ uygulamasının, trombosit a adrenerjik reseptörlerinde epinefrin etkisi için spesifik desensitizasyon ile sonuçlandığı gösterilmiştir (47).

PLA₂, IP turnover'ı sırasında PA'den araşidonik asit salınımını katalizler. Ayrıca, PLA₂'nin fosfotidil kolin ve fosfotidil etanolaminden araşidonik asit salınımına aracılık ettiği de gösterilmiştir (20,46). DAG lipazın da, PIP₂ hidrolizi sırasında açığa çıkan DAG'den araşidonik asit serbestleşmesine yol açtığı, trombin ile uyarılan trombositlerde DAG'ün major araşidonik asit kaynağı olduğu öne sürülmektedir (20,48).

TİROZİN FOSFORİLASYONU

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar trombin, trombosit aktive edici faktör (PAF), kollajen, vazopressinin, trombositlerde, protein tirozin kinaz aktivitesini artırdığını göstermiştir (49-51). Proteinlerde, tirozin rezidülerinin fosforilasyonun hücre büyümesinde rol oynadığı, bir çok büyüme faktörünün tirozin spesifik kinazlar olduğu bilinmektedir (52,53). Trombositlerde p60, pp60 başta olmak üzere yüksek tirozin kinaz aktivitesi saptanmıştır. Bu kinazlar ile 60kDa, 122kDa,

95-97kDa proteinlerin fosforilasyonu gösterilmiştir (50,51,54,55).

Trombosit fonksiyonları ve aktivasyonunda tirozin kinazların rolü araştırılmaktadır. IP döngüsü, agregasyon ve sekresyon fonksiyonları ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Erbstatin gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin trombin ile indüklenen agregasyon ve sekresyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (51,56,57). Ancak trombositler yüksek doz trombin ile uyarıldıklarında inhibisyon olmadığı (49) ve granül sekresyonunun tirozin fosforilasyonundan bağımsız olduğuna dair bulgular da vardır (51).

İnsan ve tavşan trombositlerinde, tirozin fosforilasyonunun, PLC'yi G proteinlerden bağımsız olarak aktive ettiği gösterilmiştir (51). Bazı spesifik proteinlerin tirozin rezidülerinin fosforilasyonu, sitozolik ve depo Ca düzeylerini değiştirmektedir. Hücre içi Ca²⁺ düzeyi artınca, 130 kDa proteinin tirozin rezidüsü (PIP₂ hidrolizi ve araşidonik asit metabolik ürünlerinden bağımsız olarak) fosforile olmaktadır. 130kDa proteinin fosforilasyonu, plazma membranında Ca²⁺ kanallarının açılmasını ve Ca²⁺ girişini indükler. Ca depolarının Ca²⁺ ATPaz aracılığı ile dolması 130kDa proteini defosforile eder ve plazma membranında Ca²⁺ kanalı inaktive olur (55).

Bazı proteinlerin tirozin fosforilasyonunun c-AMP'nin trombositler üzerindeki inhibitör etkisinde rol oynadığı gösterilmiştir (9,58).

GPIIb-IIIa kompleksinin aktivasyonu ve ekspresyonunda da bazı spesifik proteinlerin tirozin fosforilasyonunun rol oynadığı düşünülmektedir. Fibrinojenin GPIIb-IIIa'ya bağlanmasını inhibe eden peptitler tirozin fosforilasyonunu da inhibe etmektedir (50,51, 54,56).

Tirozin fosforilazların da trombosit aktivasyonu ve fonksiyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir. Protein fosfataz inhibitörleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, bu fosfatazların trombin ve kollajen tarafından reseptör bağımlı mekanizmalar ile inhibe edildiklerini göstermiştir (50,52).

ADENİLAT SIKLAZ VE c-AMP

Bir çok hücrede, uyarıcı ikincil haberci olarak fonksiyon gören c-AMP trombositlerde inhibitör etkiye sahiptir. c-AMP, adenilat siklaz enziminin aktivitesi ile oluşur. Adenilat siklaz aktivitesi G proteinler tarafından regüle edilir. PGI₂ gibi ajanlar Gs aracılığı ile adenilat siklazı aktive ederek c-AMP konsantrasyonunu artırır. Trombin, epinefrin gibi ajanlar ise Gi aracılığı ile adenilat siklazı inhibe ederler (5, 10, 14, 26, 60).

c-AMP dinlenme durumundaki ve aktif trombositlerde sitozolik Ca²⁺ düzeyini düşürür. Ca²⁺-Mg²⁺

ATPaz aktivitesini artırarak başta DTS olmak üzere depo organellere Ca^{2+} girişini artırdığı bilinmektedir (11, 60). Ayrıca trombosit membranında c-AMP bağımlı protein kinaz varlığı gösterilmiştir. Bu enzimin ile 22kDa proteinin fosforilasyonu trombosit membranına Ca^{2+} bağlanmasını artırmaktadır (11, 60). c-AMP'nin trombin ile uyarılan trombositlerde PLC aktivitesini baskılayarak DAG oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. c-AMP düzeyinin artması ile PKC aktivitesinin de inhibe olduğu bildirilmektedir (9, 26). Kollajen ile uyarılan trombositlerde ise cAMP'nin DAG oluşumunu etkilemediği gösterilmiş ve bu agonistin sitozolik Ca^{2+} düzeyini farklı yollardan artırdığı sonucuna varılmıştır (29).

c-GMP

Hücre metabolizmasının düzenlenmesinde potent bir ikincil haberci olarak bilinen c-GMP trombositlerde IP hidrolizini ve sitozolik Ca^{2+} artışını baskılar (61,62). GMP'nin membrandan hücre içine Ca^{2+} alımının inhibe ettiği, DTS'de Ca depolanmasını değiştirmedeği gösterilmiştir (29, 63, 64) c GMP'nin, IP_3 oluşumunu ise, G protein bağımlı bir mekanizma ile inhibe ettiği düşünülmektedir. Ayrıca c-GMP fosfodiesterazı inhibe ederek c-AMP düzeyini artırır (29, 64, 65). c-GMP sentezi guanilat siklaz tarafından katalizlenmektedir. Nitrovazodilatörlerin radikal NO grubu ile trombositlerde guanilat siklaz aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (62). Endojen NO'nun da c-GMP için regülatuar bir faktör olduğu öne sürülmektedir (63, 64, 65, 66). 12-hidroksieikosatetraenoik asidin (12-HETE) guanilat siklaz aktivitesini artırarak trombosit fonksiyonlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (67).

AGONİSTLER

ADP

ADP ilk tanımlanan trombosit agonistidir. 1960 yılında, eritrositlerden kaynaklanan küçük bir molekülün trombositlerin cama adezyonunu uyardığı gösterilmiştir. Daha sonra, bu bileşiğin ADP olduğu ve trombosit agregasyonunu da tetiklediği saptanmıştır (60).

Normal koşullarda ADP plazmada bulunmaz. Vasküler hasar sırasında eritrositler ve endotel hücrelerinden serbestleşir. Trombositlerin yoğun granülleri de önemli ADP kaynağıdır, trombositler uyarıldığında ortama salınır (9, 60,68,69). ADP'nin trombosit yüzeyinde iki farklı reseptörü olduğu düşünülmektedir. Aynı reseptör üzerinde yüksek ve düşük affiniteli iki farklı bağlanma bölgesi modeli de kabul görmektedir (60). Epinefrin ADP'nin reseptörüne affinitesini artırmaktadır. Ca^{2+} , ADP'nin yüksek affiniteli bölgeye bağlanmasını indükler (31,60).

İn vitro koşullarda ortama ADP eklenmesi trombositlerde şekil değişikliği, fibrinojen reseptörünün ekspi-

resyonu ve primer agregasyona yol açmaktadır. Fibrinojen reseptörü membran üzerindeki GPIIb-IIIa kompleksidir. Dinlenme durumundaki trombositlerde fibrinojenin bağlanmasına uygun değildir. Trombositlerin ADP ile uyarılması sonucu bağlanmaya uygun duruma gelir. Diğer agonistler de fibrinojen reseptörünün ekspresyonuna yol açar. Ancak ADP oluşumunu azaltan enzim sistemlerinin tüm agonistlerle fibrinojen bağlanmasını azalttığı gösterilmiştir (60,70). ADP ile uyarılan trombositlerde, Na^+/H^+ pompası aktivitesi ile sitozolik pH ve hücre içine Ca^{2+} girişi ile hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımının artmaktadır (60).

ADP'nin bir diğer etkisi PGI_2 ile uyarılan adenilat siklazın inhibisyonudur. Bu etki ile fibrinojen reseptörünün ekspresyonu birbirinden bağımsızdır. Kalıtsal kanama diyatezi olan bir grup hastada ADP ile bozuk agregasyon yanıtına rağmen c-AMP düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Flurosulfonyl benzoil adenozin (FSBA) ile ADP'nin indüklediği agregasyonun inhibe olduğu, adenilat siklaz üzerine etkisinin değişmediği gösterilmiştir. p-cıva benzen sulfonat ise agregasyonu etkilemeden ADP'nin adenilat siklaz üzerine etkisini inhibe etmektedir (9).

ADP'nin IP üzerine etkileri konusunda çelişen sonuçlara rastlanmaktadır. ADP'nin trombositlerde PA düzeyi üzerine etkisini araştıran gruplardan bir kısmı PA düzeyinin arttığını, bir kısmı ise değişmediğini bildirmektedir. Ayrıca türler arasında da farklar olduğu vurgulanmaktadır (71). Bir çok araştırmacı ADP ile uyarılan trombositlerde IP oluşumunu gösterememiştir. ADP ile PLC aktivasyonunda da değişme olmadığı bildirilmiştir (72). ADP'nin trombin ve TxA_2 gibi agonistlerden farklı olarak PLC ile PIP_2 hidrolizi olmaksızın primer agregasyonu uyardığı sonucuna varılmıştır (9,60,72).

Diğer taraftan araşidonik asit metabolizmasında lipoksijenaz yolağının ADP ile indüklenen trombosit aktivasyonunda önemli rol oynadığı öne sürülmüştür (73).

Trombin

Damar duvarı hasarında inaktif trombinin enzimatik parçalanması ile aktif trombin (a-trombin) serbestleşir. Fibrin oluşumundaki rolünün yanısıra trombin potent bir trombosit agonistidir. Bir serin proteaz olan trombin çeşitli peptit bağları hidrolize edebilir. Trombinin bu etkisi trombositlerin aktivasyonunda etkin değildir. g-trombin fibrinojeni hidrolize etmez ancak trombositleri aktive eder. g-trombin, a-trombinin sınırlı hidrolizi ile oluşur (9).

Trombin, trombositler üzerinde GPIb üzerindeki reseptörüne bağlanır. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ile trombin reseptörünün yapısı ayrıntılı olarak

tanımlanmıştır. Reseptör, yedi transmembran hidrofo-bik domain taşıyan bir reseptör ailesindedir. Amino terminali hücre membranının dışına taşar. bu bölge bir trombin substratı gibi davranmaktadır. Trombin bu bölgeyi kopararak reseptörü aktive eder (13,74).

Trombin, trombositlerde G protein aracılığı ile PLC' i aktive eder. PIP₂ hidrolizi ile IP₃ ve DAG açığa çıkar. Hücre içi Ca²⁺ artışı, eikosanoid oluşumu ve protein fosforilasyonu gözlenir (75,76,77,78).

Trombin ile uyarılan trombositlerde tirozin kinaz aktivitesi de artar. Trombinin trombositleri iki farklı şekilde uyarıldıkları öne sürülmektedir; düşük doz trombin ile aktivasyon için protein-tirozin kinaz gerekmektedir, yüksek dozda trombin ile direkt olarak PIP₂ hidrolizi olmaktadır (49).

Kollajen

Damar duvarında hasar oluşması ile endotel altından açığa çıkan kollajen ile trombositlerin teması, trombositlerde bir "lag faz" ı izleyen şekil değişikliği, agregasyon ve sekresyon reaksiyonu ile sonuçlanır (1).

Subendotelial bölgede dört tip kollajen bulunur. Tip I ve III intersitisyel tip kollajendir, IV ve V bazal membranda bulunur. Tip I, III ve IV'ün trombosit adezyonunu sağladığı gösterilmiştir (5, 9, 79). Trombositin kollajene adezyonu muhtemelen trombosit membranında bulunan çeşitli bölgeler ile kollajen fibrili üzerinde bulunan bölgelerin çoğul etkileşimi ile gerçekleşmektedir (79). Bu nedenle trombosit membranında GPIIb, 61kDa, trombosit faktör XIII, GPIa gibi çeşitli kollajen reseptörleri tanımlanmış, ancak GPIa'nın inhibisyonunun kollajen ile trombosit aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (11). Trombositlerin kollajene ilk tutunuşlarında vWF etkin rol oynamaktadır (79,80).

Trombositin kollajene adezyonu ile PLC aktive olur. Bunu PLA₂ aktivasyonu izler. Araşidonik asit metabolitlerinin (endoperoksitler ve tromboksanlar), açığa çıkması adhere olmayan trombositleri aktive ederek yanıtın amplifikasyonunu sağlar. Kollajenin, trombinden farklı olarak, hücre içi Ca²⁺ düzeyinde belirgin artış olmaksızın trombositlerde agregasyon ve granül sekresyonunu tetiklediği ve aktivasyonda trombinden farklı bir yol izlediği öne sürülmektedir (81).

Araşidonik Asit ve TxA₂

Egzojen olarak eklenen veya endojen olarak salınan araşidonik asit, siklooksijenaz ile hızla siklik prostaglandin endoperoksitlere (PGG₂ ve PGH₂) dönüşür. Ara ürünler olan endoperoksitler, trombosit aktivasyonuna yol açarlar. Bu metabolitler Tx sentetaz aktivitesi ile TxA₂'ye dönüşürler. TxA₂ bu yolun major

metabolitidir. Potent vazokonstriktör ve trombosit agonistidir (9,47).

Trombositlerin endoperoksitler ve TxA₂ için tek tip reseptörü olduğu düşünülmektedir. Endoperoksitler ve TxA₂'nin trombositlerde spesifik bölgelere bağlanmasını hücrede şekil değişikliği, agregasyon ve granül sekresyonu izler. TxA₂ ile uyarılmış trombositlerde, hücresele ve hücre dışı kaynaklı sitozolik Ca²⁺ düzeyi artışı, PIP₂ hidrolizi olduğu gösterilmiştir. c-AMP düzeyini de azaltıcı etkisi vardır (9,82).

Araşidonik asit lipoksijenaz enzimi aracılığı ile 12HETE ve 12HPETE'ye dönüşür. Bu ürünler trombosit agregasyon inhibitörüdür. Yüksek konsantrasyonlarda araşidonik asit eklenmesi trombositlerde inhibitör etki oluşturmaktadır (9).

Epinefrin

Katekolaminler önemli trombosit agonistleridir. Epinefrinin norepinefrinden çok daha potent olduğu gösterilmiştir. Ancak, trombosit aktivasyonu için gerekli epinefrin konsantrasyonu (>0.1 mmol) normal plazma düzeylerinden (0.1nmol) çok daha yüksektir. Daha düşük düzeylerde epinefrin diğer agonistlere trombosit yanıtını potansiyalize eder (9, 10). Antikoagülan olarak sodyum sitrat kullanıldığında, tek başına epinefrinin agregasyon ve sekresyona yol açtığı, huridin kullanıldığında ise bu reaksiyonların olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar epinefrinin yüksek düzeyde Ca²⁺ içeren ortamlarda trombositleri tek başına indüklediğini göstermektedir (83).

Epinefrinin trombositler üzerine birbirinden bağımsız iki etkisi vardır: Agregasyonun indüklenmesi ve adenilat siklazın inhibisyonu. Her iki etki de a₂-adrenajik reseptörler üzerinden gerçekleşmektedir. a₂-adrenajik reseptör agonisti olarak dört ayrı grup tanımlanmış olması (Grup I her iki yanıtı da uyarıcı, Grup II adenilat siklaz inhibisyonunu indükleyen, Grup III agregasyonu indükleyen, Grup IV her iki yanıtı da baskılayan) reseptör üzerinde farklı bağlanma bölgeleri olduğunu düşündürmektedir (9).

Epinefrin trombositlerde şekil değişikliğine yol açmaz. Direk olarak PLC' i aktive etmediği, Na/H exchange'ini uyardığı, pH'da artışa yol açtığı ve PLA₂'i uyardığı gösterilmiştir (10).

Epinefrinin özellikle ADP ile sinerjistik etkisi bilinmektedir. Bu etkinin aspirin uygulamasına rağmen devam etmesi TxA₂ oluşumundan bağımsız olduğunu düşündürmektedir (9,83).

b₂ adrenajik reseptörlerin uyarılması ise trombositlerde adenilat siklazı uyararak inhibisyona yol açarlar. Epinefrinin trombositler üzerine etkisi a₂ ve b₂ adrenajik reseptör yoğunluğuna ve oranına, bağlıdır. Reseptörlerin yoğunluğu türler arasında farklılık göstermektedir (9).

PAF

İnflamasyonda rol alan hücrelerde yapılabildiği buradan salınan fosfolipit yapıda bir mediatördür. Trombositler için güçlü bir aktivatördür. Hücrede şekil değişikliği, granül sekresyonu ve agregasyonu indükler. Uyarılmış trombositlerden de serbestleştiği için diğer agonistlerin etkilerini kısmen yönlendirdiği düşünülmektedir (84).

PAF reseptörünün moleküler özelliklerini belirlemeye yönelik çalışmalar sürmektedir. Hücre içi ve dışı segmentleri olan yedi transmembran domainden oluştuğu gösterilmiştir (84).

PAF'ın reseptörüne bağlanması ile PLC ve PLA₂ aktive olur. Aktivasyonun G protein aracılığı ile olduğuna dair çalışma sonuçları bulunmaktadır (10). PAF'ın tirozin kinazı uyardığı da gösterilmiştir (84,85).

KAYNAKLAR

- Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Sem Hematol* 1985; 22 (3): 219-40.
- Leung L, Nachman R. Molecular mechanism of platelet aggregation. *Ann Rev Med* 1986; 37: 179-86.
- Packham MA, Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol* 1994; 72: 278-84.
- Rao GHR. Physiology of blood platelet activation. *Indian J Physiol Pharmacol* 1993; 37(4): 263-75.
- Steen VM, Holmsen H. Current aspects on human platelet activation and responses. *Eur J Hematol* 1987; 38: 383-399.
- Zucker MB, Nachmias, V T. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 2-18.
- Gear ARL. Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events. *Can J Physiol* 1994; 72: 185-294.
- Gerrard JM. Platelet aggregation: Cellular regulation and physiologic role. *Hospital Practice* 1988; 15: 89-106.
- Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69 (1): 58.
- Brass LF, Hoxie J A, Kieber-Emmons T et al. Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993: 17-35.
- Siess W, Grünberg B, Lubert K. Functional relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993; 229-35.
- Brass LF, Manning DR, Shattil SJ. GTP-Binding proteins and platelet activation. *Hemostas Thromb* 1990;13: 127-73.
- Brass LF, Hoxie JA, Manning DR. Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993; 70(1): 217-23.
- Manning DR, Brass LF. The role of GTP-binding proteins in platelet activation. *Thromb Haemost* 1991; 66(4): 393-9.
- Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T et al. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Ann Rev Biochem* 1991; 60: 349-400.
- Cassel D, Selinger Z. Mechanism of adenylate cyclase activation by chlora toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3307.
- Manning DR, Fraser BA, Kahn RA et al. ADP-ribosylation of transducin by islet-activating protein: Identification of asparagine as the site of ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1984; 259: 749.
- Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984; 220: 345-60.
- Nomura H, Nakanishi H, Ase K et al. Inositol phospholipid turnover in stimulus-response coupling. *Hemostas Thromb* 1986, 9 : 143-58.
- Rana RS, Lowell EH. Phosphoinositides in signal transduction. 1990; 70: 121-43.
- Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-59.
- Tysnes OB. Inositol Phospholipid metabolism in resting and stimulated human platelets. *Cellular Signalling* 1992; 4: 611-17.
- Brass FB, Suresh KJ. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization and granule secretion in platelets. *The J Biol Chem* 1985; 260(28): 15172-179.
- Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 1984; 225: 1365-70.
- Putney JW, Takemura H, Hughes AR et al. How do inositol phosphates regulate calcium signalling? *FASEB J* 1989; 3: 1899-1905.
- Salzman EW, Ware AJ. Ionized calcium as an intracellular messenger in blood platelets. *Hemost Thromb* 1984;7: 177-202.
- Authi KS. Ca²⁺ homeostasis and intracellular pools in human platelets. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993:83-104.
- Sage SO, Sargeant P, Heemskerk JWM et al. Calcium influx mechanisms and signal organisation in human platelets. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993: 69-82.
- Scrutton MC. The platelet as a Ca²⁺-driven cell: mechanisms by which may modulate Ca²⁺-driven responses. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993:1-13.
- Jones GD, Gear ARL. Subsecond calcium dynamics in ADP- and Thrombin-stimulated platelets: a continuous-flow approach using Indo-1. *Blood* 1988; 71(6): 1539-1543.
- Ware AJ, Smith M, Salzman EW. Synergism of platelet-aggregating agents. *J Clin Invest* 1987; 80: 267-271.
- Ware AJ, Johnson PC, Smith M, Salzman EW. Effect of common agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets. *J Clin Invest*. 1986; 77: 878-886.
- Rink TJ, Smith SW, Tsien RY. Cytoplasmic free Ca²⁺ in human platelets: Ca²⁺ in human platelets: Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett* 1982; 148(1): 21-25.

34. Putney JW. Capacitative calcium entry revisited. *cell calcium* 1990; 11: 611.
35. Irvine RF. Quantal Ca^{2+} release and the control of Ca^{2+} entry by inositol phosphates—a possible mechanism. *FEBS Lett* 1990; 263:5.
36. Murata K, Sakon M, Kambayash, J et al. The possible involvement of protein phosphatase 1 in thrombin-induced Ca^{2+} influx of human platelets. *J Cell Biochem* 1993; 51: 442-5.
37. Fox JEB. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. In Authi KS, eds. *Mechanisms of Platelet Activation and Control*. New York: Plenum Press, 1993:175-185.
38. Fox JEB. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993; 70(6): 884-93.
39. Furman MI, Gardner TM, Goldschmidt-Clermont PJ. Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993; 70(1): 229-32.
40. Powling MJ, Hardisty RM. Glycoprotein IIb-IIIa complex and Ca^{2+} influx into stimulated platelets. *Blood* 1985; 66(3): 731-4.
41. Nakashima S, Suganama A, Matsui A et al. Thrombin induces biphasic 1,2-diacylglycerol production in human platelets. *Biochem J* 1990; 275: 355-61.
42. Werner MH, Hannun YA. Delayed accumulation of platelets as a mechanism for regulation of onset of aggregation and secretion. *Blood* 1991; 78(2): 435-44.
43. Werner MH, Senzel L, Bielaska A et al. Diacylglycerol overcomes aspirin inhibition of platelets: evidence for a necessary role for diacylglycerol accumulation in platelet activation. *Mol Pharmacol* 1991, 39: 547-56.
44. Majerus PW, Bansal VS, Lips DL et al. The phosphoinositol pathway of platelets and vascular cells. *Ann NY Acad Sci* 1991; 614: 44-50.
45. Werner MH, Bielawska A, Hannun YA. Quantitative analyses of diacylglycerol second messengers in human platelets: correlation with aggregation and secretion. *Mol Pharmacol* 1991; 41: 382-6.
46. Rao GHR. Signal transduction, second messengers, and platelet function. *J Clin Med* 1993; 121(1): 18-20.
47. Rao GHR, White JG. Influence of phospholipase A_2 on human blood platelet α adrenergic receptor function. *Thromb Res* 1989; 53: 427-34.
48. Purdon DA, Patelunas D, Smith JB. Evidence for the release of arachidonic acid through the selective action of phospholipase A_2 in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem Biophys Acta* 1987; 920: 205-14.
49. Asahi M, Yanagi S, Ohta S et al. Thrombin-induced human platelet aggregation is inhibited by protein-tyrosine kinase inhibitors, ST638 and genistein. *FEBS Lett* 1992; 309 (1): 10-4.
50. Dhar A, Shukla SD. Tyrosine kinases in platelet signalling. *Br J Haematol* 1993; 84: 1-7.
51. Pumiglia KM, Lau LF, Huang CK et al. Activation of signal transduction in platelets by tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hydroperoxide). *Biochem J* 1992; 286: 441-9.
52. Smilowitz HM, Aramli L, Xu D et al. Phosphotyrosine phosphatase activity in human platelets. *Life Sci* 1991; 49: 29-37.
53. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12.
54. Golden A, Brugge JS, Shattil SJ. Role of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in agonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet proteins. *The J Cell Biol* 1990; 111(6): 3117-27.
55. Vostal JG, Jackson WL, Shulman NR. Cytosolic and stored calcium antagonistically control tyrosine phosphorylation of specific platelet proteins. *The J Biol Chem* 1991; 266(25): 16911-916.
56. Bachelot C, Cano E, Grelac F et al. Functional implications of tyrosine protein phosphorylation in platelets. *Biochem J* 1992; 284: 923-8.
57. Salari H, Duronio V, Howard SL et al. Erbstatin blocks platelet activating factor-induced protein tyrosine phosphorylation, polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinase C activation, serotonin secretion and aggregation of rabbit platelets. *FEBS Lett* 1990; 263(1): 104-8.
58. Pumiglia KM, Huang CK, Feinstein MB. Elevation of cAMP, but not cGMP, inhibits thrombin-stimulated tyrosine phosphorylation in human platelets. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 171(2): 738-45.
59. Siess W, Lapetina EG. Functional relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. *Biochem J* 1990; 271: 815-9.
60. Gachet C, Cazenave JP. ADP induced blood platelet activation: a review. *Nouv Rev Fr Hematol* 1994; 33: 347-58.
61. Johansson JS, Haynes DH. Cyclic GMP increases the rate of the calcium extrusion pump in intact human platelets but has no direct effect on the dense tubular calcium accumulation system. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1105: 40-50.
62. Wu X, Brüne B, Von Appen F, Ullrich V. Efflux of cyclic GMP from activated human platelets. *Mol Pharmacol* 1992; 43: 564-8.
63. Severina IS, Belushkina NN. Increase in activating ability of human platelet guanylate cyclase during aggregation. *Biochem Int* 1992; 28(4): 621-31.
64. Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 1987; 39: 163-96.
65. Maurice DH, Haslam RJ. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 671-81.
66. Gerzer R, Karrenbrock, Siess W et al. Direct comparison of the effects of nitroprusside, sin 1, and various nitrates on platelet aggregation and soluble guanylate cyclase activity. *Thromb Res* 1988; 52: 11-21.
67. Brüne B, Ullrich V. Different calcium pools in human platelets and their role in thromboxane A_2 formation. *The Journal of Biol Chem* 1991; 266(29): 19232-237.
68. Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, Kinglough-Rathbone et al. Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates. *Blood* 1990; 75 (5): 1081-86.
69. Born GVR. Adenosine diphosphate as a mediator of platelet aggregation in vivo: an editorial view. *Circulation* 1985; 72 (4): 741-6.
70. Shattil SJ, Brass LF. Induction of fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *The J Biol Chem* 1987; 262(3): 992-1000.
71. Vickers JD, Kinglough-Rathbone R, Packham MA et al. Inositol phospholipid metabolism in human platelets stimulated by ADP. *Eur J Biochem* 1990; 193: 521-528.

72. Packham PA, Livne A, Ruben D et al. Activation phospholipase C and protein kinase C has little involvement in ADP-induced primary aggregation of human platelets: effects of diacylglycerols, the diacylglycerol kinase inhibitor R59022, staurosporine and okadaic acid.
73. Borin ML, Pinelis VG, Ivanova MA et al. Blockade of ADP-induced Ca-signal and platelet aggregation by lipoxigenase inhibitors. FEBS LETTERS 1989; 257: 345-7.
74. Coughlin SR. Thrombin receptor structure and function. Thromb Haemostas 1993; 66(1): 184-7.
75. Nagashima S, Suganuna A., Matsui A et al. Thrombin induces a biphasic 1,2-diacylglycerol production in human platelets. Biochem J 1991; 275: 355-61.
76. Huang EM, Detweiler TC. Reassessment of the evidence for the role of secreted ADP in biphasic platelet aggregation. J Lab Clin Med 1980; 95: 59-63.
77. Puri RN, Colman RW. Thrombin- and cathepsin G-induced platelet aggregation: Effect of protein kinase C inhibitors. Anal Biochem 1993; 210: 50-7.
78. Skeaff CM, Holub BJ. Altered phospholipid composition of plasma membranes from thrombin-stimulated human platelets. Biochim Biophys Acta 1985; 834: 164-71.
79. Packham MA, Mustard JF. Platelet adhesion. Prog Hemostas Thromb 1984; 7:211-88.
80. Hardisty RM. Molecular mechanism of platelet adhesion. Adv Exp Med Biol 1985; 192: 411-8.
81. Watson SP, Reep B, McConnell RT et al. Collagen stimulates 3H inositol triphosphate formation in indomethacin treated human platelets. Biochem J 1985; 226: 831-7.
82. Saussy DL, Mais DE, Baron DA et al. Subcellular localization of a thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor antagonist binding site in human platelets. Biochem Pharmacol 1988; 37(4): 647-54.
83. Keraly CL, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA et al. Conditions affecting the responses of human platelets to epinephrine. Thromb Haemostas 1988; 60(2): 209-16.
84. Shukla SD. Platelet activating factor receptor and signal transduction mechanisms. FASEB J 1992; 6: 2296-301.
85. Dhar A, Paul AK, Shukla SD. Platelet activating factor stimulation of tyrosine kinase and its relationship to phospholipase C in rabbit platelets: Studies with genistein and monoclonal antibody to phosphotyrosine.