

CO MUSÍ VĚDĚT INTERVENČNÍ KARDIOLOG O KREVNÍCH DESTIČKÁCH

M. Malý, I. Marinov, M. Oravec, J. Veselka

Souhrn

Krevní destičky jsou klíčovým elementem ve vzniku aterosklerotické trombózy jako podkladu akutního koronárního syndromu. Znalost patofyziologie adheze, aktivace a agregace je nutná pro interpretaci terapeutických zásahů při prevenci vzniku a léčby trombózy. Funkční testování účinnosti léčby protideštičkovými léky, byť zatím není rutinně prováděno, bude v budoucnu patrně cestou k dalšímu snížení výskytu trombotických komplikací.

Klíčová slova

krevní destičky – adheze – agregace – funkční testy – aspirin – clopidogrel – prasugrel

Abstract

What is important for an interventional cardiologist to know about thrombocytes. Thrombocytes are crucial elements in the development of arterial thrombosis as an underlying condition of the acute coronary syndrome. Knowledge of the pathophysiology of adhesion, activation and aggregation of thrombocytes is essential for the interpretation of therapeutic targets for thrombosis prevention and treatment. Functional testing of the efficacy of antiplatelet drugs, though not yet routinely performed, is likely to bring further decline in thrombotic complications in the near future.

Keywords

thrombocytes – adhesion – aggregation – functional testing – aspirin – clopidogrel – prasugrel

Úvod

Krevní destičky hrají klíčovou úlohu ve vzniku arteriálního trombu nasedajícího na aterosklerotický plát, který je substrátem vzniku akutního koronárního syndromu. Znalost patofyziologie aktivace, adheze a agregace krevních destiček je pro kardiologa nepostradatelná pro prevenci a léčbu trombotických komplikací, včetně uplatnění doporučených postupů v praxi.

Patofyziologie aktivace, adheze a agregace krevních destiček

Trombocyty jsou nejmenší formované elementy krve. Jsou to bezjaderné okrouhlé disky o průměru 2–5 μm a tloušťce 0,5–1 μm . Tvar destiček je udržován marginálními mikrotubuly, které plní funkci skeletu. V cytoplazmě je abundanční množství kanálků a vezikul, které jsou významné pro sekreční funkci destiček. Vzhledem k tomu, že trombocyty neobsahují jádro, nemají vlastní DNA a jejich schopnost syntetizovat bílkoviny se donedávna považovala za velmi nízkou. Proto je poměrně překvapivým nálezem výsledek proteomické analýzy, která prokázala schopnost destiček exprimovat po stimulaci

trombinem více než 300 proteinů, které se nevyskytovaly v klidovém stavu [1]. Hlavním energetickým zdrojem destiček je glukóza získávaná z plazmy a nevelké zásoby glykogenu, což svědčí pro intenzivní metabolismus. Samy destičky obsahují tři typy granul: a) denzní granula mající skladovací funkci pro serotonin, kalcium, adenosindifosfát a adenosintrifosfát, b) alfa-granula obsahující směs proteinů (destičkový faktor 4, růstový faktor, fibrinogen, faktor V a beta-tromboglobulin) a c) lysozomy obsahující enzymy štěpící bílkoviny a sacharidové komplexy. Počet destiček je 200–400 $\times 10^9$ /litr krve. Doba života destiček je 9–12 dnů, což má význam pro reverzibilitu účinku protideštičkových léků. Destičky pocházejí z megakaryocytů kostní dřeně. Regulace jejich tvorby je řízena trombopoetinem, který je tvořen v ledvinách.

Aktivace a adheze destiček

Destičky hrají klíčovou roli v reakci cévy na její poškození. Po inzultu dojde k uvolnění destičkových denzních granul, které obsahují adenosindifosfát (ADP), a tím se aktivují okolní destičky. Zároveň se uvolňují i alfa granula, která

obsahují proteiny a proteinové mediátory, jež se účastní zánětlivých procesů. Na povrchu destiček je množství receptorů pro ostatní buňky, zahrnující aktivované buňky cévní stěny a proteiny extracelulární matrix. Destičky vykazují velkou schopnost adheze, zvláště ke strukturám poškozené cévní stěny, kde uvolňují obsah svých granul a dochází k jejich agregaci. Tímto mechanismem hrají klíčovou úlohu v mnoha procesech cévní stěny, včetně vzniku akutního koronárního syndromu (AKS).

Za normálních okolností se destičky vyskytují v klidovém stavu a k místu poškození se dostávají pasivně krevním proudem. Iničiálně adherují k místu poškození interakcí s von Willebrandovým faktorem (vWF), který je proteinem extracelulární matrix produkovaným endotelálními buňkami. Destičkový glykoprotein Ib/IX/V se volnou vazbou váže s vWF a umožňuje „rolování“ destiček na poškozeném povrchu cévní stěny. Destičky jsou poté ukotveny vazbou s receptory pro kolagen (glykoprotein Ia/IIa nebo integrin $\alpha 2\beta 1$) a glykoproteinem VI, což vede k intracelulární signalizaci a aktivaci destiček. Destičková aktivace je následována pevnou adhezí mezi dalším integrinem – glykoproteinovým receptorem IIb/IIIa – mezi destičkami navzájem. Tato vazba vede k mezi-destičkové agregaci.

Agregace destiček

Destičkový fibrinogenový receptor (glykoprotein IIb/IIIa) je integrin, který se váže na epitop proteinů arginin-glycin-kyselina asparagová (RGD), jako je fibrinogen. Fibrinogen má dvojnásobnou symetrii s RGD skupinou na obou koncích molekuly, čímž se stává ideální molekulou pro mezideštičkovou vazbu. V klidovém stavu jsou destičkové receptory IIb/IIIa neaktivní, exprimují se na destičkovém povrchu po aktivaci a vazbou s fibrinogenem umožňují destičkovou agregaci (obr. 1).

Aktivační receptory

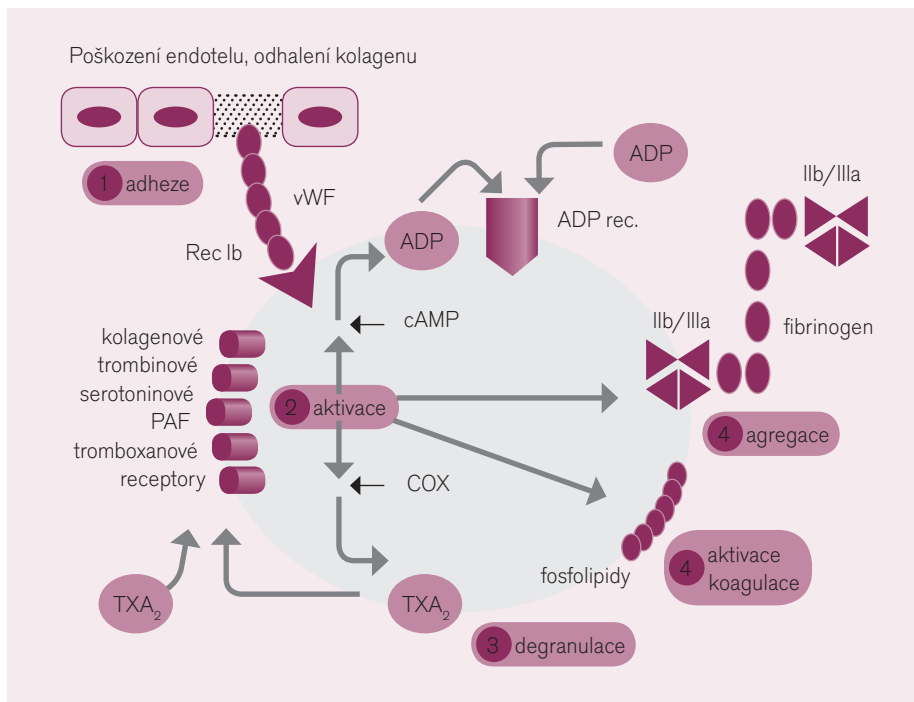
Na povrchu destiček se nacházejí další receptory zodpovědné za jejich aktivaci. Jedním z nich je skupina receptorů pro ADP. Jakmile je ADP uvolněn z destičky, může dojít k aktivaci jiných destiček vazbou na jejich ADP receptor. Signalizace z ADP receptoru P2Y₁₂ cestou G proteinu je spojena s adenylátcyklázou, enzymem, který katalyzuje konverzi adenosintrifosfátu na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), jehož vysoké hladiny inhibují destičkovou funkci. Při vazbě ADP na receptor P2Y₁₂ dojde za prvé k blokadě adenylátcyklázy, tím k poklesu hladiny cAMP a v důsledku toho k aktivaci destiček [2,3] a za druhé dojde k aktivaci fosfolipid 3-kinázy, což má za následek mohutnou agregaci destiček [4,5].

Další cestou zprostředkování aktivace a agregace je fosfolipáza A₂, která uvolňuje z povrchu destičky kyselinu arachidonovou, jež je dále metabolizována cyklooxygenázou a tromboxansyntetázou na tromboxan A₂, který vede k uvolnění destičkových granula a agregaci dalších destiček [6].

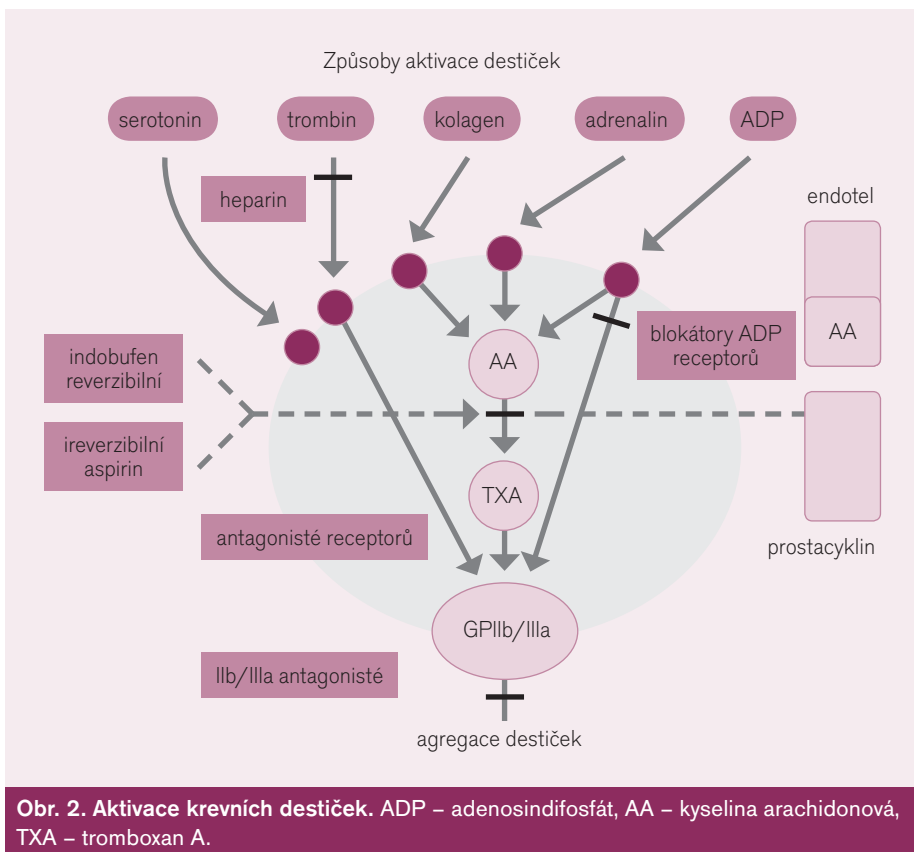
Významnou měrou se na aktivaci destiček podílí trombin, který tímto vytváří spojnicí mezi koagulační kaskádou a agregací. Všechna antitrombotika (tedy i heparin) mají proto i antiagregační účinek cestou inhibice trombinem zprostředkované aktivace destiček [7] (obr. 2).

Vyšetření funkce krevních destiček

V souvislosti s extenzivní protideštičkovou léčbou u aterosklerotické choroby, individuální odpovědi na léčbu clopidogrelem a katastrofálními důsledky trombózy stentů je velká snaha o rutinní vyšetřování efektu protideštičkové léčby. Nicméně dosud má tento postup velké limitace: a) není shoda na typu používaného testu, b) není žádná shoda na definici „non-responderů“, c) není žádný velký klinický důkaz, že léčba vedená na základě výsledku testů zlepšuje klinické cílové ukazatele, d) v současnosti je monitorování léčby doporučeno pouze v rámci klinického výzkumu, i když studie provedené na malých souborech naznačují prospěch z takto vedené léčby; nicméně tato data nemají dostatečnou sílu opravňující k rutinnímu používání v denní praxi. Je nutno vyčkat na výsledky probíhajících studií s individualizovanou léčbou ADP blokátory, jako jsou studie GRAVITAS či ARCTIC [8]. Tento závěr se však autorům jeví jako příliš rigorózní a domníváme se, že je již shromážděno dostatečné množství teoretických i klinických dat k tomu,



Obr. 1. Schéma adheze, aktivace a agregace krevních destiček. vWF – von Willebrandův faktor, ADP – adenosindifosfát, TXA₂ – tromboxan A₂, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, COX – cyklooxygenáza, PAF – destičkový aktivační faktor.



Obr. 2. Aktivace krevních destiček. ADP – adenosindifosfát, AA – kyselina arachidonová, TXA – tromboxan A.

aby se alespoň u nemocných s trombotickými komplikacemi po koronárních intervencích další protideštičková léčba (zvláště léčba ADP blokátorem) řídila výsledkem vyšetření funkce destiček.

VerifyNow

Z potenciálních kandidátů na monitorování funkce krevních destiček ve specifických podmínkách kardiologie se nabízí metoda VerifyNow, jejími výhodami jsou možnost monito-

race u lůžka nemocného a jednoduchost použití (na rozdíl od optické agregometrie se provádí vyšetření přímo z plné krve). Princip metody je stejný jako u optické agregometrie – změna průchodu světla vzorkem po přidání agonistů agregace. Neagregované destičky mají větší součet povrchů, a tudíž kladou procházejícímu světlu větší překážku než agregované destičky, kde je součet povrchů větších agregovaných částic menší, a tudíž je větší propustnost pro světlo. Čím vyšší je průchodnost pro světlo, tím větší je míra agregace (po přidání agonisty agregace, např. ADP), a tím menší je účinnost protideštičkové léčby [9].

VASP index

Metoda VASP (vasodilator stimulated fosfoprotein) je metodou založenou na fosforylaci VASP, který je intracelulárním destičkovým proteinem. Tato metoda je specifická pro ADP stimulaci, neboť jeho fosforylace je závislá na stupni aktivace P2Y₁₂ receptoru. Pokud dojde ke stimulaci P2Y₁₂ receptoru ADP, dojde k jeho defosforylaci. Naopak inhibice receptoru clopidogrelem vede k aktivaci kinázy, zvýšení hladin cAMP a VASP fosforylaci. Úroveň fosforylace/defosforylace VASP tedy velmi citlivě odráží aktivaci/deaktivaci receptoru P2Y₁₂. Stupeň VASP fosforylace lze přesně stanovit metodou průtokové cytometrie. Tato metoda je vysoce specifická i senzitivní pro léčbu thienopyridiny a obecně jakýmkoliv léky interagujícími s receptorem

P2Y₁₂ [10]. Vyjádřením míry blokády receptoru je tzv. PRI – platelet reactivity index. Hodnota tohoto indexu pod 50 % má vysokou negativní prediktivní hodnotu pro trombotické komplikace po koronárních intervencích [11] (obr. 3).

Shrnutí současných doporučení protideštičkové léčby [8]

Elektivní perkutánní koronární intervence

Aspirin: 250 mg bolus s následnou léčbou 75–100 mg p. o. denně [12].

Clopidogrel: 600 mg nasycovací dávka s následnou léčbou 75 mg p. o. denně [13].

GP IIb/IIIa inhibitory: podání pouze v situaci „bail-out“ (trombus, „no reflow“, vysoce komplexní léze) [12].

Akutní koronární syndrom bez ST elevací – NSTEMI/UA

Aspirin: 250 mg bolus s následnou léčbou 75–100 mg p. o. denně [14].

Clopidogrel: 600 mg nasycovací dávka s následnou léčbou 75 mg p. o. denně.

Prasugrel (alternativa clopidogrelu): 60 mg nasycovací dávka s následnou léčbou 10 mg p. o. denně (výjimka u nemocných s anamnézou cévní mozkové příhody, starších 75 let a s váhou méně než 60 kg) [15].

GP IIb/IIIa inhibitory: doporučeny u vysoce rizikových PCI během intervence při časném invazivním vyšetření do 24 hod od vzniku [16].

Akutní infarkt myokardu s ST elevací – STEMI

Aspirin: 250 mg bolus s následnou léčbou 75–100 mg p. o. denně.

Clopidogrel: 600 mg nasycovací dávka s následnou léčbou 75 mg p. o. denně.

Prasugrel (alternativa clopidogrelu): 60 mg nasycovací dávka s následnou léčbou 10 mg p. o. denně (výjimka u nemocných s anamnézou cévní mozkové příhody, starších 75 let a s váhou méně než 60 kg). Prasugrel byl inkorporován do současných doporučení ACC/AHA pro STEMI [15,17].

GP IIb/IIIa inhibitory: klinická data jsou rozporuplná, přednemocniční podání není doporučeno a během primární PCI je podání vyhrazeno pro vysoce rizikovou intervenci s doporučeným podáním intrakoronárně [18].

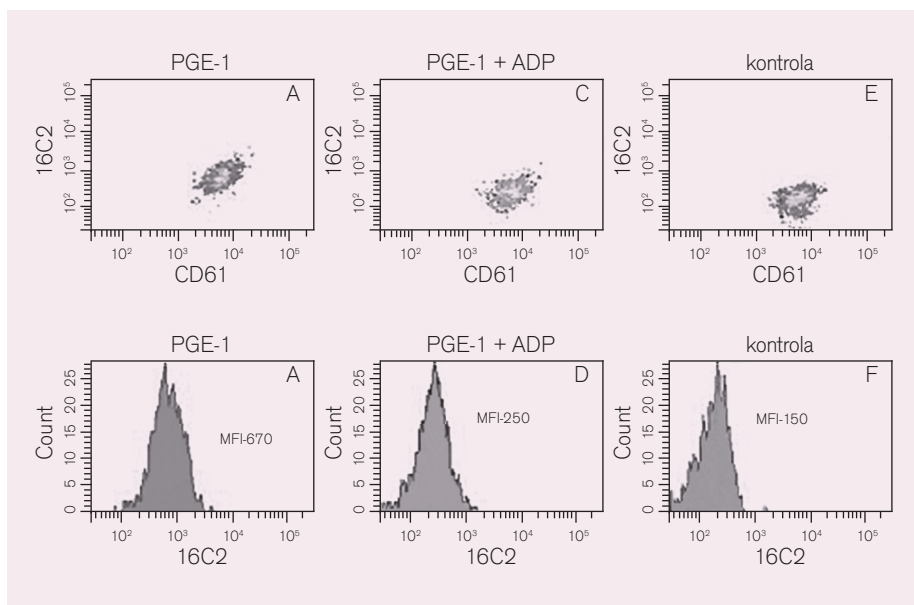
Závěr

Znalost základních patofyziologických mechanismů aktivace, adheze a agregace jako základu vzniku arteriálního trombu je nutná ke správně vedené protideštičkové léčbě na základě doporučených postupů. Funkční testy účinnosti protideštičkové léčby stále ještě hledají své místo, nicméně v budoucnu jsou cestou k dalšímu snížení trombotických komplikací. Zároveň se vyvíjejí nové protideštičkové léky s příznivějším farmakologickým profilem, jako je např. ticagrelor s reverzibilním účinkem, s nímž již byla úspěšně dokončena studie PLATO [19]. Stále ještě zůstává mnoho nezodpovězených otázek: doba trvání duální protideštičkové léčby, individualizace na základě výsledků funkčních vyšetření, postavení nových protideštičkových léků, postavení blokátorů IIb/IIIa a jejich rutinní podávání a individuální posouzení rovnováhy mezi protideštičkovou léčbou a rizikem krvácení. Na většinu z těchto otázek odpoví probíhající klinické studie.

Podpořeno grantem MZČR číslo 00064203.

Literatura

1. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004; 103: 2096–2104.
2. Haslam RJ, Davidson MM, Desjardins JV. Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. *Biochem J* 1978; 176: 83–95.
3. Savi P, Pflieger AM, Herbert JM. cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 249–252.



Obr. 3. Výsledek vyšetření VASP. Trombocyty inkubujeme s PGE1 (A, B) a PGE1 + ADP (C, D). Fosforylaci VASP detekujeme po permeabilizaci trombocytů nepřímou fluorescencí za použití monoklonální protilátky -16C2. Stanovením PRI (Platelet Reactivity Index) podle vzorce $PRI = \frac{MFIc(PGE1) - MFIc(PGE1+ADP)}{MFIc(PGE1)} \times 100$ hodnotíme kapacitu ADP blokovat VASP fosforylaci.

4. Trumel C, Payrastré B, Plantavid M et al. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 1999; 94: 4156–4165.

5. Kauffenstein G, Bergmeier W, Eckly A et al. The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin – a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett* 2001; 505: 281–290.

6. Bultas J, Karetová D. Je protideštičkové léčba indikována v primární prevenci? *Kardiol Rev* 2007; 9: 242–246.

7. Kottke-Marchant K. Importance of platelets response in acute coronary syndromes. *Cleve Clin J Med* 2009; 76: S2–S7.

8. Cuisset T, Valgimigli M, Mudra H et al. Rationale and use of antiplatelet and antithrombotic drugs during cardiovascular interventions: May 2010 update. *Eurointervention* 2010; 6: 39–45.

9. Magniacapra F, DeBruyne B, Muller O et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel: extent of coronary atherosclerosis and periprocedural myocardial infarction in patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv* 2010; 3: 35–40.

10. Schwarz UR, Geiger J, Walter U et al. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets – definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1145–1152.

11. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S et al. Adjusted Clopidogrel Loading Doses According to Vasodilator-Stimulated Phosphorylation Index Decrease Rate of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With

Clopidogrel Resistance. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1404–1411.

12. Silber S, Albertsson P, Avilés FF et al. Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26: 804–847.

13. Montalescot G, Sideris G, Meuleman C et al. ALBION Trial Investigators. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 931–938.

14. Task Force for Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of European Society of Cardiology, Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28: 1598–1660.

15. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH et al. TRITON-TIMI 38 Investigators. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357: 2001–2015.

16. Mehta SR, Granger CB, Boden WE et al. TIMACS Investigators. Early versus delayed invasive intervention in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 360: 2165–2175.

17. Kushner FG, Hand M, Smith SC Jr et al. American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2009 Focused Updates: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation

Myocardial Infarction (updating the 2004 Guideline and 2007 Focused Update) and ACC/AHA/SCAI Guidelines on Percutaneous Coronary Intervention (updating the 2005 Guideline and 2007 Focused Update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2009; 120: 2271–2306.

18. Thiele H, Schindler K, Friedenberger J et al. Intracoronary compared with intravenous bolus abciximab application in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: the randomized Leipzig immediate percutaneous coronary intervention abciximab IV versus IC in ST-elevation myocardial infarction trial. *Circulation* 2008; 118: 49–57.

19. Cannon CP, Harrington RA, James S et al. PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) Investigators. Comparison of Ticagrelor With Clopidogrel in Patients With a Planned Invasive Strategy for Acute Coronary Syndromes (PLATO): A Randomised Double-Blind Study. *Lancet* 2010; 375: 283–293.

Doručeno do redakce 23. 6. 2010

Přijato po recenzi 12. 7. 2010

MUDr. Martin Malý, Ph.D.¹
MUDr. Iuri Marinov, CSc.²
MUDr. Milan Oravec¹
prof. MUDr. Josef Veselka, CSc.¹

¹Kardiovaskulární centrum,
 Fakultní nemocnice v Motole, Praha
²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha
martin.maly@fnmotol.cz

WWW.KARDIOLOGICKAREVUE.CZ