

## Vyšetrovacie metódy krvných doštičiek – stručný prehľad

Varga I.

Kardiologická klinika, Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a. s., Bratislava

### Súhrn

Krvné doštičky sú dôležitou súčasťou cirkulácie a hemostázy. Pomocou adhézie, zmeny tvaru, agregácie, degranulácie a prokoagulačných aktivít zabezpečujú integritu cievneho riečiska. Ich hypofunkcia sa prejaví krvávacím stavom, hyperfunkcia naopak náchylnosťou k prevažne arteriálnej trombóze. Súčasnú vyšetrovaciu funkciu krvných doštičiek predstavujú širokú škálu dobre prepracovaných postupov. Ani jeden z nich však sôlo nepodáva úplnú informáciu o stave krvných doštičiek u konkrétneho pacienta. Je preto žiaduce, aby bol na použitie diagnostických testov funkcií krvných doštičiek vypracovaný štandardný univerzálny vyšetrovací algoritmus. Túto potrebu v súčasnosti zvyrazňuje aj problém tzv. rezistencie voči antiagregačnej liečbe.

**Kľúčové slová:** krvné doštičky, vyšetrovacie metódy, krvávacé stavy, arteriálna trombóza, rezistencia na antiagregačnú liečbu

### Summary

Varga I.: Platelet tests – concise overview

Platelets are an important part of circulation and hemostasis. They preserve vascular integrity by adhesion, shape change, aggregation, release reaction and procoagulant activities. Their hypofunction results in bleeding disorders, hyperfunction conversely to especially arterial thrombosis susceptibility. Current evaluating methods of platelet function represent wide scale of well sophisticated techniques. None of them alone can unfortunately completely inform about platelet function in actual patient. Therefore, there is a need to formulate a standard universal evaluating algorithm for the use of platelet function tests. In addition, this necessity has been highlighted today by so-called resistance to antiplatelet agents.

**Key words:** platelets, evaluating methods, bleeding disorders, arterial thrombosis, resistance to antiplatelet agents

*Trans. Hemat. dnes, 13, 2007, No. 4, p. 184–191.*

### Úvod

Vyšetrovacie metódy krvných doštičiek vychádzajú z poznania ich fyziológie a patofyziológie. Predstavujú širokú škálu dobre prepracovaných metód, z ktorých však zatiaľ ani jedna – vzhľadom na určité limitácie – nedosiahla univerzálne rozšírenie. Potreba vypracovania všeobecne platného algoritmu analýzy funkcie krvných doštičiek sa tak stáva čoraz aktuálnejšou, aj vzhľadom na pomerne časté zlyhávanie antiagregačnej prevencie či liečby.

### Referencia

#### Fyziológia krvných doštičiek

Krvné doštičky (KD) cirkulujú za normálnych okolností v krvi ako malé bezjadrové disky a ich hlavnou funkciou je aktívna účasť v procese hemostázy. Pri poškodení cievnej steny, odhalení protrombogénnych hmôt aterosklerotického plátu, uvoľnení aktivačných látok (tzv. agonistov) z krvných elementov, vyplavení humorálnych aktivátorov do systémovej cirkulácie alebo po ich podaní z externého prostredia dochádza k zmenám tvaru i funkčnej odozve krvných doštičiek. Uvoľnené látky, schopné aktivovať KD, sa viažu na svoje špecifické proteínové receptory: glykoproteíny (GP-y), recep-

tory pre trombín, prostanoidy, adenosíntrifosfát, ale tiež selektívny a intercelulárne adhezívne molekuly.

Po väzbe ligandu na tieto receptory je signál odovzdávaný ďalej cez proteíny viažuce guanozíntrifosfát (GTP) – tzv. G-proteíny a malé GTP-ázy. Tieto proteíny sú vlastne druhí poslovia transformujúci signál na enzymatickú kaskádu, ktorej aktivita vedie k ďalším zmenám. Výnimkou z tohto celého procesu je otvorenie iónového kanálu priamo po väzbe ligandu na receptor (napr. adenosíntrifosfát naviazaním sa na receptor P2X<sub>1</sub> umožní vstup ionizovaného vápnika priamo do cytoplazmy KD). Ďalšie zmeny zahŕňajú predovšetkým zvýšenie intracelulárnej hladiny vápnika – (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>, jednak spomenutým vstupom cez iónové kanály, ale tiež prostredníctvom enzýmov v plazmatickej membráne KD (Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-výmenník, Ca<sup>2+</sup>-adenosíntrifosfatázy) alebo jeho vyplavením zo zásob v endoplazmatického retikule. Vápnik aktivuje fosfolipázu C, Ca<sup>2+</sup>-dependentný enzým katalyzujúci hlavne premenu fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu na inozitol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol. Ide o tzv. fosfatidylinozitolový obrat. Inozitol-1,4,5-trifosfát zvyšuje späťne hladinu (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> jeho vyplavením z intracelulárnych zásob a diacylglycerol aktivuje proteínkinázu C. Tá je skupinou viacerých enzýmov, ktoré kontrolujú agregáciu, degranuláciu (uvoľnenie obsahu intracelulárnych granúl – viď nižšie), mobilizáciu Ca<sup>2+</sup>, tvar KD a diferenciáciu megakaryocytov. Iným výkonným enzýmom v aktivácii KD je fosfolipáza A<sub>2</sub>, ktorá hydrolyzuje este-

ry glycerofosfolipidov, pričom sa uvoľňujú voľné mastné kyseliny (kyselina arachidónová a iné) a lyzofosfolipidy. Uvoľnená kyselina arachidónová je substrátom pre tvorbu endoperoxidov – prostaglandínu  $G_2$  a  $H_2$  prostredníctvom cyklooxygenázy 1 (COX-1). COX-1 je hlavný enzým metabolizujúci kyselinu arachidónovú v krvných doštičkách. Prostaglandín  $H_2$  je ďalej tromboxánsyntetázou premieňaný na tromboxán  $A_2$ , silný aktivátor KD. Jeho väzba s príslušným receptorom v membráne KD spôsobuje zmenu tvaru doštičiek, ich agregáciu a sekréciu granulárneho obsahu. Aktivácie doštičiek sa zúčastňujú tiež fosfolipáza D a systém tyrozínkináz. Inhibične naopak pôsobia cyklické nukleotidy – cyklický adenosínmonofosfát a guanosínmonofosfát. Znižujú činnosť aktivačných enzýmov a vedú k poklesu  $(Ca^{2+})_i$  (1).

Agregáciu krvných doštičiek spravidla predchádza ich adhézia. Prvým krokom v adhézii (prilnutí) KD k endotelu cievy je v skutočnosti väzba plazmatického von Willebrandovho faktora (vWf) na obnažený kolagén v cievnej stene. Potom nasleduje väzba KD na vWf cez glykoproteín GPIb/V/IX. To je impulzom pre uchytenie ďalších cirkulujúcich KD. Tie putujú v smere krvného prúdu a vznik či zánik ich väzieb s vWf je podkladom tzv. rolovania doštičiek. Na tomto procese sa spolupodieľa aj väzba glykoproteínového ligandu viažúceho P-selektín (PSGL-1) na povrchu KD s P-selektínom (adhezívna molekula) na povrchu endotelových buniek. Za pomoci ďalších receptorov napr. pre kolagén, fibronektín, fibrinogén (GPIIb/IIIa) a napokon pre laminín dochádza k pevnému ukotveniu KD (2, 3).

Pevnú adhéziu dopĺňa zmena tvaru KD – rozprestretie prostredníctvom GPIIb/IIIa. Rozprestretie do plochy umožňuje doštičkám pokryť maximum poškodenej oblasti. Po počiatočnom zaguľatení, dochádza k vytvoreniu nitkovitých výbežkov (filopódií) a celá doštička sa sploští. Z disku tak vzniká dendritický útvar, ktorý sa neskôr pomocou tenučkých výbežkov – lamelipódií zmení na úplne plošné teleso pripomínajúce pizzové cesto. Povrch doštičky sa takto zväčší približne 4-násobne (4).

Proces agregácie (zhlukovania sa) krvných doštičiek môžeme rozdeliť na dve fázy – primárnu (reverzibilnú – väzba KD cez vWf a GPIb/IX/V) a sekundárnu (ireverzibilnú – väzba KD cez fibrinogén a GPIIb/IIIa) spojenú s degranuláciou KD. Ireverzibilná agregácia je vyvolaná pôsobením aktivačnej látky (agonistu) pri pôsobení v dlhšej časovej perióde alebo pri vyššej koncentrácii. Základom agregácie KD je ich vzájomné spojenie fibrinogénovými mostíkmi prostredníctvom GPIIb/IIIa. Uvoľnené substancie z  $\alpha$ - a  $\delta$ -granúl (napr.  $\beta$ -tromboglobulín, doštičkový faktor 4, P-selektín z  $\alpha$ -granúl alebo adenosínzindifosfát – ADP - z  $\delta$ -granúl) stupňujú signalizáciu z receptorov, zosilňujú prebiehajúcu aktiváciu, priťahujú ďalšie KD, vedú ku kompletnej degranulácii a agregácii KD ako aj k rozvoju ich prokoagulačných vlastností. K posledne menovanej vlastnosti prispievajú predovšetkým membránové fosfolipidy, ktoré sú súčasťou koagulačnej kaskády a tiež vychytávanie tkanivového faktora

syntetizovaného monocytmi. Silnú stimuláciu KD spravidla aj uvoľnenie mikročastíc (sú to často fragmenty doštičkovej membrány), ktoré majú prokoagulačný charakter. Napokon agregáciu zosilňuje aj samotnými doštičkami novosyntetizovaný tromboxán  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) (viď vyššie) (3, 5).

### Krvné doštičky – vyšetrovacie metódy

Vyšetrovacie metódy, ktorými hodnotíme počet a funkciu krvných doštičiek, sa neustále zdokonaľujú vzhľadom na pribúdajúce poznatky o význame KD v rôznych patofyziologických procesoch. V zásade poznáme dva druhy vyšetrovacích metód: a) koagulačné, b) prietokovo-cytometrické (6). Z hľadiska samotného vyšetrovacieho postupu rozlišujeme tiež: 1. globálne testy doštičkových funkcií, 2. testy adhézie a agregácie KD, 3. postupy hodnotiace hladinu produktov a súčastí krvných doštičiek uvoľňovaných pri ich aktivácii do cirkulácie, 4. posudzovanie funkcie KD prietokovou cytometriou, 5. meranie prokoagulačnej aktivity KD a napokon 6. analýzu polymorfizmov doštičkových receptorov (7).

#### Globálne testy doštičkových funkcií

Najstaršou z týchto metód je in vivo hodnotenie času krvácania, ktoré zaviedol do praxe Duke v roku 1912. Jeho najbežnejšou modifikáciou je tzv. Ivyho metóda, pri ktorej meriame čas, za ktorý prestane krvácanie spôsobené presne charakterizovaným rezom (10 mm dĺžka, 1 mm hĺbka) na volárnej strane predlaktia (norma 4–8 minút). Rezu predchádza nafúkanie manžety tlakomeru na 40 mmHg na ramene vyšetovaného. Istú medzilaboratórnu reprodukovateľnosť umožňujú komerčne vyrábané pomôcky (Simplat), ktoré zaisťujú jednotnú veľkosť zárezu. Test je citlivý na ochorenia s poruchou cievnej steny, trombocytopéniu (počet KD pod  $100 \times 10^9/l$ ), stavy so zníženou hladinou von Willebrandovho faktora a fibrinogénu (6, 7). Jeho výhodou je in vivo fyziologické stanovenie času potrebného na vytvorenie krvnej zrazeniny. Hlavnými nevýhodami testu sú nedostatočná senzitivita a špecifická, interpersonálna variabilita v závislosti od vyšetrujúceho, možnosť vzniku nepríjemných jaziev (8). Patologické hodnoty testu sú typické pre rôzne typy trombocytopatií, ako aj pre deficit či defekty koagulačných faktorov.

Novšou z globálnych metód hodnotenia funkcií KD je využitie PFA-100® in vitro analyzátoru (obr. 1). Umožňuje kvantitatívne hodnotenie primárnej, t. j. KD sprostredkovej hemostázy. Vyšetrujeme funkciu KD v plnej krvi s pridaním antikoagulačnej prísady (napr. citrát). Princípom je stanovenie tzv. closure time, čiže času potrebného na uzavretie kapiláry doštičkovým trombom. KD sú vháňané pod tlakom (simulácia zvýšeného šmykového napätia – shear stress – pri prúde krvi cez zúžený priesvit tepien pri aterosklerotickom procese) cez testovaciu komôrku (cartridge). Komôrky sú potiahnuté prozráčavou membránou obsahujúcou buď adenosínzindifosfát (ADP) a kolagén (tzv. CADP membrána) alebo kolagén a epinefrín (tzv. CEPI membrána) (7, 9). Výho-

VARGA J. ET AL.

dou testu je jeho jednoduchosť, rýchlosť, potreba malého objemu krvi, simulácia tzv. shear stress a analýza z plnej krvi. Pri patologických hodnotách oboch testov je vysoko pravdepodobná porucha funkcie KD u daného pacienta. Normálny výsledok CADP testu, ale abnormálny CEPI test, je typický po užití kyseliny acetylsalicylovej (ASA). Nevýhodou metodiky je naopak závislosť výsledku na hladine vWf, hematokrite, počte KD a štandardizácii inštrumentária. Test využívame pri hodnotení účinnosti ASA, antagonistov GPIIb/IIIa receptora a tiež v skríningu trombocytopatií či koagulopatií (8, 10).

Inou metódou uvedenou v literatúre je hodnotenie adhézie a agregácie KD či koagulačných reakcií pomocou tzv. Xylum clot signature® analyzátora. Prístroj zaznamenáva čas potrebný na obnovenie tlaku v prietokovej komôrke, ktorý poklesol v dôsledku jej arterficálneho poškodenia. K obnoveniu tlaku dôjde po vytvorení agregátu a následnom obnovení integrity steny poškodenej komôrky (tzv. platelet haemostasis time). Inokedy je hodnotený čas po ktorom klesne tlak až na nulové hodnoty v dôsledku obturácie prietokovej komôrky vytvoreným trombom – tzv. clotting time. Treťou možnosťou je zmeranie času potrebného na pokles prietokového tlaku v komôrke na 50 % pri využití proagregačného charakteru kolagénovej membrány (7). Napriek tomu, že merania majú slušnú senzitivitu pri hodnotení krvácajúcich komplikácií a vyšetrojeme v plnej krvi, prístroj sa nedostal do širšieho používania. Nedostatočne totiž rozlišuje medzi podielom doštičiek a koagulácie na krvácavom stave, má nízku špecificitu. Vyšetrenie v plnej krvi bez antikoagulačnej prísady vyžaduje spracovanie vzorky do 3 minút. Prístroj je tiež príliš veľký – pacient sa musí osobne dostať priamo na miesto vyšetrenia, preto je nevhodný na

vyšetrovanie hospitalizovaných pacientov. Taktiež vyžaduje zahriatie a kalibráciu pred použitím (11).

#### Testy adhézie a agregácie krvných doštičiek

Pojem adhézia označuje schopnosť KD priľnúť k poškodenému povrchu. Najznámejším testom adhézne schopnosti KD je metóda využívajúca pretlačenie nezrážavej krvi cez umelohmotnú trubicu obsahujúcu sklenné guľičky. Rozdiel v počte KD pred a po prechode trubicou je hodnotiacim parametrom adhézie doštičiek. Porušená adhézna schopnosť KD je napr. pri von Willebrandovej chorobe či niektorých trombocytopatiách (6).

Historickým zlatým štandardom posúdenia funkcie KD, ktorý uviedol do praxe Gustav Boru, je však hodnotenie ich agregácie – schopnosti vytvárať zhluky. Existujú 2 spôsoby agregometrie: a) turbidimetrický – hodnotenie agregácie KD pomocou zmeny v intenzite prechodu svetla (transmitancii) cez plazmu bohatú na KD a b) impedančný, pri ktorom stanovujeme zmeny v odpore elektrického prúdu medzi dvoma elektródami pri vzniku doštičkových agregátov v plnej krvi. Plazmu bohatú na KD získavame centrifugáciou plnej krvi, pričom je možné hodnotiť v nej spontánnu i indukovanú agregáciu. Ako induktory agregácie KD môžeme použiť pomerne široké spektrum substancií, najpoužívanejšími však sú ADP, kolagén, adrenalín, kyselina arachidónová, ristocetín, peptid aktivujúci trombínový receptor (TRAP) či monoklonálne protilátky (napr. anti-CD9, anti-GPIIIa). Agregometriou spravidla zaznamenáme tzv. prvú vlnu agregácie KD, ktorá je dôsledkom aktivácie KD pridaným agonistom. V závislosti od druhu a koncentrácie agonistu, ako aj od funkčnosti KD môžeme pozorovať následne druhú vlnu agregácie, ktorá je dôsledkom degranulačnej reakcie KD (6, 7) (obr. 2). Napr.



Accumetrics®



Agregometria podľa Borna



Chrono-log® - impedančný agregometer



PFA-100®



Plateletworks®



Prietoková cytometria

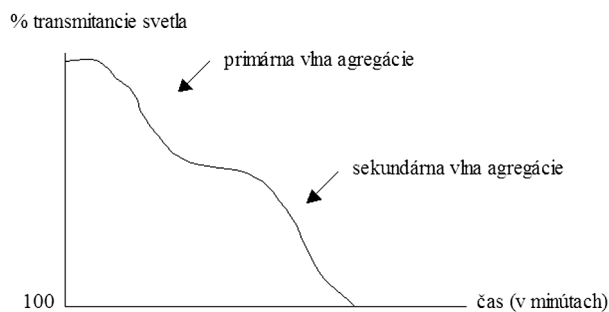
**Obr. 1.** Dostupné metódy analýzy funkcií krvných doštičiek.

(prevzaté z prezentácie: Calatzis A. Multiplate analysis. A new approach to platelet function analysis in whole blood. Z materiálov poskytnutých firmou GNOSIS s. r. o.)

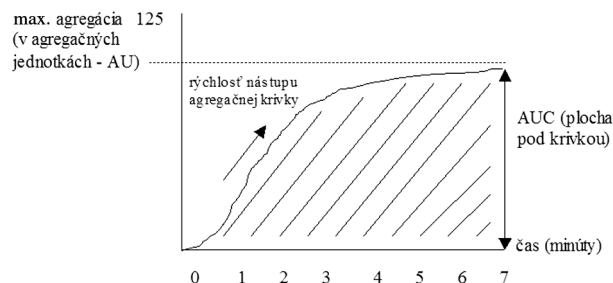
nízke koncentrácie ADP vyvolajú bifázickú agregáciu (t. j. prvú i druhú vlnu agregácie), veľmi nízke koncentrácie indukujú len prvú agregáciu vlnu nasledovanú disagregáciou a naopak veľmi vysoké koncentrácie navodia jednu masívnu agregáciu (12). Zvýšená agregácia sa typicky vyskytuje u pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami, diabetes mellitus, hyperlipidémiou, či napr. u fajčiarov. Znížená odpoveď sa vyskytuje pri trombocytopatiách (Bernardov-Soulierov syndróm, Glanzmannova trombasténia), pri urémii, myeloproliferatívnych ochoreniach alebo systémovom lupus erythematosus (13). Výhodou agregometrie je pomerne presné vyhodnotenie agregácie aktivity KD, avšak za cenu časovej a finančnej náročnosti. Pri získavaní plazmy bohatej na doštičky sú funkcie KD čiastočne alterované už v priebehu samotnej prípravy. Vyšetrenie agregácie KD v plnej krvi predstavuje preto fyziologickejší variant hodnotenia tejto vlastnosti KD (8). Sledovanými parametrami sú rýchlosť nástupu agregácie krivky, dosiahnutá maximálna agregácia a plocha pod agregáčnou krivkou (obr. 3).

Novšiu metódu hodnotenia antidoštičkovej terapie pomocou turbidimetrického princípu ponúka systém Ultegra®. Nezáživá krv je nasávaná do kanálka, ktorý obsahuje fibrinogénom potiahnuté mikročastice spolu s induktormi agregácie KD. Hodnotiacim parametrom je vzostup prieniku svetla vzorkou. Po vytvorení agregátov sa totiž plocha, ktorú zaberajú KD zmenší, dôjde k „vyčíreniu“ vzorky a prechod svetelných lúčov sa zvýši. Výsledky sú prepočítané na tzv. PAU (platelet aggregation units) – jednotky agregácie doštičiek (9). Výsledky dobre korelujú s konvenčnou agregometriou (14). Výhodou je rýchlosť a jednoduchosť merania, stanovenie v plnej krvi a potreba malého objemu vzorky. Nevýhodou je vysoká cena vyšetrenia a nejednotnosť inštrumentária (8). Systém však ponúka možnosti hodnotenia účinnosti ASA, tienopyridínových preparátov i GPIIb/IIIa antagonistov, čo vedie aj k jeho postupnému zaraďovaniu do klinickej praxe (9, 10).

Produkt Plateletworks® je inou metodikou, ktorá ponúka rýchle orientačné zhodnotenie funkcie KD. Porovnáva sa pri nej počet KD vo vzorke plnej krvi pred a po aplikácii induktora agregácie v špeciálnej skúmavke. Agregované KD nie sú v ďalšom meraní započítané do celkového počtu doštičiek vo vzorke a rozdiel (pokles)



Obr. 2. Bifázická krivka agregácie krvných doštičiek.



Obr. 3. Sledované parametre pri impedančnej agregometrii.

v počte KD je hodnotiacim parametrom funkcie KD (12). Výhodou je opäť analýza z plnej krvi a potreba minimálnej manipulácie so vzorkou, nevýhodou nedostatočne zdokumentovaná validita výsledkov (8).

Hodnotenie aktivácie KD šmykovým napätím umožňuje napr. CTA analyzátor® (z angl. cone and plate analyzer). Ide o typ rotačného viskozimetra, ktorý hodnotí adhézne schopnosti doštičiek v plnej krvi s antikoagulačnou prísadou (citrát). Po úprave polystyrénových zásobníkov (premytie a ofarbenie napr. May-Grünwaldovou metódou) je do nich krv nadávkovaná a následne rotovaná pri vysokých otáčkach s použitím teflónového kužeľa. Hodnotí sa percento plochy pokrytej adhezanými doštičkami (15). Výhodou je jednoduchosť a rýchlosť vyšetrenia, malý objem krvi potrebný na analýzu, ako aj vysoké šmykové napätie a možnosť hodnotenia v plnej krvi. Nevýhodou zatiaľ malé rozšírenie a nemožnosť medzilaboratórnej korelácie výsledkov (8).

#### Vyšetrenie krvných doštičiek prietokovou cytometriou

Metóda je založená na inkubácii plnej krvi s monoklonálnymi alebo polyklonálnymi protilátkami proti rôznym doštičkovým glykoproteínom (napr. P-selektínu, GPIIb/IIIa, CD40) alebo ich ligandom (fibrinogén, CD40L ap.). Protilátky sú detekované pomocou fluorescenčných markerov, ktoré spôsobujú charakteristickú absorpciu a neskôr emisiu prechádzajúceho svetelného lúča. Tieto zmeny sníma svetelný senzor, ktorý vie pomocou nich zhodnotiť veľkosť a molekulové charakteristiky vyšetrovaných buniek. Pomocou prietokovej cytometrie môžeme hodnotiť aktivované cirkulujúce KD, agregáty KD, agregáty leukocytov s KD či doštičkové prokoagulačné mikročastice (9). Prietoková cytometria je metódou vhodnou aj na posudzovanie účinnosti protidoštičkovej liečby (napr. pri liečbe antagonistami GPIIb/IIIa stanovíme pomocou špecifickej protilátky percento neobsadených molekúl GPIIb/IIIa, čo nám ozrejmi účinnosť alebo zlyhanie želanej inhibície). Taktiež môžeme prietokovou cytometriou diagnostikovať defekty doštičkových receptorov pri rôznych trombocytopatiách (napr. Glanzmannovej trombasténii alebo Bernardovom-Soulierovom syndróme) alebo poruchy vo funkcii skladovacích granúl KD (napr. Heřmanského-Pudlákov syndróm, syndróm šedých doštičiek či tzv. storage pool disease, čo je názov pre porušenie funkcie  $\delta$ -granúl) (6). Výhodou prietokovej cytometrie je možnosť analýzy širokého spektra doštičkových funkcií a morfológických

VARGA J. ET AL.

zmien s nimi spojených, realizácia meraní v malom množstve plnej krvi a tiež schopnosť hodnotenia aktivácie KD ako in vivo, tak aj in vitro (7). Hlavnými nevýhodami sú nutnosť prípravy vzorky pred samotnou analýzou, vysoké náklady na zariadenie a nevyhnutnosť kvalifikovaného personálu (8).

#### Výšetrenie aktivity krvných doštičiek molekulovými markermi

Ako molekulové markery aktivity KD využívame jednak látky uvoľňované doštičkami v procese degranulácie, jednak molekuly nimi syntetizované v priebehu ich aktivácie. Nevyhnutnými podmienkami odberu krvi na stanovenie je minimalizácia traumatizujúceho vplyvu vpichu a rýchly transport vzorky v ľade do laboratória (16).

Typickými degranulačnými molekulami sú  $\beta$ -tromboglobulín a doštičkový faktor 4, ale aj rozpustný P-selektín, ktoré sú uvoľňované do plazmy z  $\alpha$ -granúl. Ich hladinu stanovujeme pomocou enzýmoimunoanalýzy a rádioimunoanalýzy. Ide o pomerne spoľahlivé metódy určenia aktivity KD, avšak aj tieto majú svoje nedostatky. Separácia plazmy môže viesť totiž k arteficiálnej aktivácii KD a tým skresleniu – nadhodnoteniu získaných výsledkov. Plazmatický polčas doštičkového faktora 4 je veľmi krátky (cca 5 minút, následne je vychytávaný endotelovými bunkami), hladiny  $\beta$ -tromboglobulínu zasa stúpajú pri obličkovej nedostatočnosti. Rozpustný P-selektín je do plazmy uvoľňovaný aj z Weibel-Paladeho teliesok endotelových buniek, pričom v publikovaných prácach boli rozdiely v udávaných normálnych hladinách ako aj ich veľká interindividuálna variabilita. Meranie hladiny glykoproteínu V (GPV), špecifického proteínu KD a megakaryocytov, je inou možnosťou hodnotenia aktivity KD (16). Nevýhodami pri jeho stanovení je opäť možnosť arteficiálneho ovplyvnenia KD pri získavaní plazmy, ako aj fakt, že toto

meranie je vzhľadom na funkciu GPV odrazom len trombínom indukovanej aktivácie KD. Problém s arteficiálnou modifikáciou činnosti KD sa týka aj stanovenia plazmatickej hladiny rozpustného CD40L. CD40L je uvoľňovaný z cytoplazmy a membrány doštičiek, pričom práve KD predstavujú majoritný zdroj tejto molekuly v plazme (8).

Stanovenie hladiny tromboxánu  $A_2$ , jeho metabolitu – tromboxánu  $B_2$  alebo ich ďalších metabolitov, či už v plazme alebo v moči, sú pomerne často a široko využívanými metodikami hodnotenia aktivácie KD. Miestom syntézy tromboxánu sú však aj napr. monocyty, takže vyšetrovacía metóda je nedostatočne špecifická. Navyše močová exkrécia tromboxánu  $B_2$  je priamo ovplyvnená funkciou obličiek (7, 8).

#### Hodnotenie prokoagulačnej aktivity krvných doštičiek

Metódy hodnotenia vplyvu KD na koagulačnú kaskádu sa opierali najmä o analýzu vzniku a aktivity protrombinázového komplexu, tzn. komplexu faktorov  $Xa$  a  $Va$  naviazaných na fosfolipidový povrch KD. Vzhľadom na technickú náročnosť a zatiaľ neoverenú validitu v klinickej praxi t. č. neprenikli do širšieho používania ako diagnostické metódy (7).

#### Genetické metódy

Analýza polymorfizmov jednotlivých nukleotidov či oligonukleotidov pomocou amplifikácie sledovaného úseku DNA polymerázovou reťazovou reakciou a následným štiepením kópií reštrikčnými enzýmami je metódou, ktorá prebieha dnes azda najrýchlejším vývojom. Informuje totiž bezkonkurenčne o interindividuálnej variabilite vo funkcii KD a s tým súvisiacim rizikom predovšetkým arteriálnej trombózy ako aj odpovede na antitrombotickú liečbu. Finančná a metodická náročnosť sú však zatiaľ limitáciou rozšírenia postupov v každodennej praxi (7).

Tab. 1. Krvácavé stavy pri nedostatku/zlyhaní funkcie krvných doštičiek.\*

<i>Kvantitatívne poruchy (trombocytopenie)</i>
– nedostatočná tvorba KD v kostnej dreni (napr. aplastická anémia, trombocytopenia po chemoterapii, rádioterapii ap.)
– skrátené prežívanie KD z dôvodu ich rýchlejšieho odbúravania (napr. idiopatická trombocytopenická purpura)
– porušená distribúcia krvných doštičiek (napr. hypersplenizmus, hypertermia)
– zvýšená strata KD (krvácanie, dialýza, mimotelový obeh)
<i>Kvalitatívne poruchy (trombocytopatie)</i>
<b>a) vrodené</b>
– poruchy membrány KD (Bernardov-Soulierov syndróm, Glanzmannova-Naegeliho trombasténia)
– poruchy skladovacích granúl KD ( $\delta$ -granúl – Heřmanského-Pudlákov syndróm, Wiskottov-Aldrichov syndróm či $\alpha$ -granúl – napr. syndróm sivých doštičiek)
– poruchy enzymatickej výbavy KD (napr. defekt COX-1 alebo tromboxánsyntetázy)
– poruchy receptorov (napr. porucha receptora $TXA_2$ , ktorá znefunkční degranuláciu)
<b>b) získané</b>
– chronické myeloproliferatívne choroby, lymfoproliferatívne alebo renálne ochorenia
– po liekoch (napr. kyseline acetylsalicylovej), popáleninách, po alkohole
– ochorenia obličiek
– po liekoch (napr. kyseline acetylsalicylovej), popáleninách, po alkohole ap.
– pri získaných poruchách skladovacích granúl (napr. pri disseminovanej intravaskulárnej koagulopatii, hemolyticko-uremickom syndróme, trombotickej trombocytopenickej purpure)

\* pre bližšie informácie pozri citáciu č. 17

**Tab. 2.** Stavy so zvýšenou aktiváciou krvných doštičiek a tendenciou k arteriálnej trombóze.\*\*

<i>a) dedičné protrombotické stavy</i>
– hyperhomocysteinémia, hyperfibrinogénia, mutácia faktora V (Leiden)
– mutácia génov pre trombomodulín, inhibitor aktivátora plazminogénu 1, selektívny P, E
– polymorfizmy doštičkových glykoproteínov Ib, IIIa, IaIIa
<i>b) stavy so zvýšenou aktiváciou krvných doštičiek</i>
– nestabilná angina pectoris, infarkt myokardu, cievná mozgová príhoda
– perkutánna angioplastika, arteriálne bypassy, skladovanie transfúzií trombocytov
– diabetes mellitus, hyperlipidémia, fajčenie
<i>c) trombocytóza (skôr sekundárne zvýšenie počtu krvných doštičiek)</i>
– pri infekciách, zápaloch, krvácaní, fyzickom či psychickom vypätí, po splenektómii ap.
<i>d) trombocytémia (myeloproliferatívny proces v kostnej dreni)</i>
– pri chronickej myeloidnej leukémii, pravej polycytémii, esenciálnej trombocytémii, celulárnej fáze idiopatickej myelofibrózy

\*\*pre bližšie informácie pozri citácie č. 5 a 17

### Klinické stavy s poruchou krvných doštičiek (trombocytov)

Diagnostickými metódami sa snažíme ozrejmiť či a do akej miery sú práve KD a ich funkcie zodpovedné za riešený klinický stav. Ochorenia v dôsledku poruchy počtu alebo funkcie KD sa prejavujú buď vo forme krvácajúceho stavu (hypofunkcia) alebo zvýšenej tendencie predovšetkým k arteriálnej trombóze (hyperfunkcia).

Krvácajúce stavy pri poruche KD sa najčastejšie manifestujú na koži (petechie, sufúzie) alebo na slizniciach (epistaxa, hematúria, ap.). Etiológiu a stručné rozdelenie krvácajúcich stavov na podklade nedostatku KD – kvantitatívnych porúch (trombocytopenií) alebo zlyhania funkcie KD – kvalitatívnych porúch (trombocytopatií) prináša tabuľka 1.

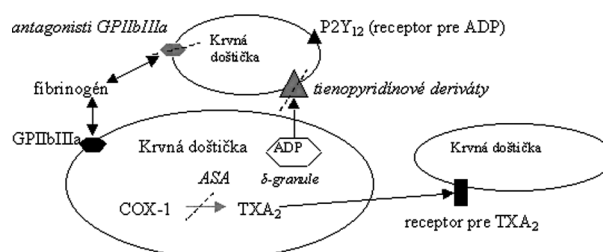
Zvýšená aktivácia KD vyúsťujúca do progresie aterosklerotického procesu a neustále stúpajúceho výskytu vaskulárnych komplikácií (napr. akútneho infarktu myokardu či cievnych mozgových príhod) je oveľa častejším klinickým problémom. Stavy hyperfunkcie KD môžu byť primárne navodené zmenou v ich štruktúre alebo sú súčasťou komplexnejších protrombotických stavov – v stručnom prehľade ich prináša tabuľka 2.

### Rezistencia na antiagregačnú liečbu – aktuálny klinický problém

Popri komplikovanej, často substitučnej liečbe krvá-

cavých stavov spôsobených poruchou KD, ktorých problematika je užšou problematikou predovšetkým hematológov, sa do popredia dostáva otázka nedostatočne efektívnej liečby vaskulárnych komplikácií. Kardiovaskulárne a cerebrovaskulárne príhody naďalej totiž figurujú na popredných priečkach v príčine mortality, morbidity, invalidity a v socio-ekonomických dopadoch na obyvateľstvo našich zemepisných šírok. Prítom máme minimálne tri účinné spôsoby prevencie a liečby arteriálnej trombózy. Je to kyselina acetylsalicylová (aspirín, ASA), tienopyridínové deriváty (tiklopidín a klopidogrel) a antagonisty GPIIb/IIIa (schéma 1).

V poslednej dobe sa intenzívne skúma podstata zlyhávania prevencie podávania aspirínu či klopidogrelu



**Schéma 1.** Mechanizmy pôsobenia dostupných protidoštičkových liekov (pre lepšie pochopenie viď vyššie – fyziológia krvných doštičiek).

**Tab. 3.** Možné príčiny rezistencie voči antiagregačnej liečbe (upravené podľa cit. č. 18).

Vonkajšie (extrinsic)	Vnútorne (intrinsic)
– nedostatočné užívanie liekov (slabá compliance) zo strany pacienta	– aktivácia KD nezablokovanými metabolickými dráhami (kolagénom, indukcia prostredníctvom ADP z erytrocytov či iných KD, epinefrínom či trombínom ap.)
– neadekvátna dávka	– podávanie iných liekov antagonizujúcich účinok ASA na cyklooxygenázu-1
– fajčenie	– vyššia citlivosť KD ku kolagénu či ADP
– farmakokinetické interakcie (na úrovni vstrebávania, metabolizmu – cytochróm CYP3A4, vylučovania)	– tvorba TXA <sub>2</sub> dráhami nezablokovanými ASA (napr. COX-2 v monocytoch, makrofágoch, endoteli či mladých KD)
– zvýšená spontánna aj enzymatická hydrolýza ASA (napr. diabetes mellitus 2. typu)	– genetické polymorfizmy v metabolizme kyseliny arachidónovej či v receptoroch KD (variabilita receptoru P2Y <sub>12</sub> , vzostup počtu receptorov, ap.)
– zvýšený obrat KD pri niektorých ochoreniach (napr. diabetes mellitus) alebo pri určitých stavoch (napr. aortokoronárny bypass)	

(vystriedal starší a z hľadiska nežiaducich účinkov škodlivejší tiklopidín), ktorú označujeme aj pojmom rezistencia – v anglosaskej literatúre „aspirin resistance“ resp. „clopidogrel resistance“. Rozlišujeme rezistenciu: a) klinickú, ktorá spôsobuje nedostatočnú ochranu pacienta pred vznikom trombotických komplikácií alebo b) biochemickú. Tou označujeme neschopnosť napr. ASA v terapeutickej dávke navodiť predĺženie protrombínového času, redukovať syntézu TXA<sub>2</sub> alebo spôsobiť očakávaný inhibičný efekt v jednom alebo viacerých in vitro testoch funkcií krvných doštičiek. Možné príčiny prináša v prehľade tabuľka 3. Rezistencia je nedosiahnutie očakávaného účinku pri adekvátne dlhej liečbe medikamentom v dostatočnej dávke, ktorú môžeme objektivizovať špecifickou, validnou a spoľahlivou laboratórnou metódou zameranou na sledovanie antidoštičkového efektu sledovanej látky, pričom táto metóda musí mať významnú, nezávislú a konzistentnú koreláciu so zvýšeným výskytom aterotrombotických cievnych príhod (18, 19). To je práve zatiaľ problém, ako vyplýva aj z vyššie uvedeného prehľadu vyšetrovacích metód. Dnes je možné z hľadiska monitorovania účinnosti antigregancií využiť agregometrické merania, systémy Ultegra® či PFA-100®, či prietokovú cytometriu.

Súčasnými možnosťami prekonania rezistencie je používanie adekvátnych terapeutických dávok (napr. pre ASA 75–150 mg/deň, pre klopidogrel 75 mg/deň), prísna compliance zo strany pacienta, odstránenie vonkajších (ovplyvniteľných) možných príčin a tiež použitie iných antiagregačných látok (20). Jednou z ciest môže byť aj snaha o potvrdenie a využitie aditívnych antidoštičkových vlastností u liekov už používaných v iných indikáciách.

## Záver

Z horeuvedeného prehľadu vyplýva potreba jednotného univerzálneho konsenzu pri využití už dostupných vyšetrovacích metód krvných doštičiek, ako aj nutnosť ich neustáleho zdokonaľovania. Je na nás – lekároch, výskumných pracovníkoch, farmaceutoch, ale aj na pacientoch, aby sme spoločným úsilím neustále rozširovali prah poznania nielen cestou klinických štúdií („evidence based medicine“), ale predovšetkým každodennou ústretovou komunikáciou. Týmto spôsobom môžeme rýchlejšie dospieť k definícii spoľahlivej vyšetrovacej metódy krvných doštičiek a stanoveniu účinnej antiagregačnej liečby.

### Zoznam skratiek

ADP – adenosíntrifosfát  
 ASA – kyselina acetylsalicylová  
 AU – jednotky agregácie krvných doštičiek  
 CADP – kolagén a adenosíntrifosfát  
 CD – identifikačný povrchový antigén bunky  
 CEPI – kolagén a epinefrín  
 COX-1 – cyklooxygenáza 1  
 GP – glykoproteín

GTP – guanozíntrifosfát  
 KD – krvné doštičky  
 PAU – jednotky agregácie krvných doštičiek  
 PSGL-1 - glykoproteínový ligand pre P-selektín  
 TRAP – peptid aktivujúci trombínový receptor  
 TXA<sub>2</sub> – tromboxán A<sub>2</sub>  
 vWf – von Willebrandov faktor

### Podakovanie

„*Touto cestou by som rád poďakoval prof. MUDr. J. Fabiánovi, DrSc. a doc. MUDr. E. Goncalvesovej, CSc. za ich osobný príklad, ktorým ovplyvnili moje ďalšie profesionálne smerovanie.*“

## Literatúra

1. **Kamath S, Blann AD, Lip GY.** Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart* 2001; 22:1561-1571.
2. **Hrachovinová I, Malý M.** Patofyziologie arteriální trombózy. In: Vojáček J, Malý M, et al. Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi. 1. vyd. Praha, Grada Publishing 2004; 69–78.
3. **Packham MA, Rand ML, Kinlough-Rathbone RL.** Aggregation. In: Gesele P, Page C, Fuster V, Vermylen J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. First edition. Cambridge, Cambridge University Press, 2002; 338–356.
4. **Gear AR, Polanowska-Grabowska RK.** The platelet shape change. In: Gesele P, Page C, Fuster V, Vermylen J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. First edition. Cambridge, Cambridge University Press, 2002; 319–327.
5. **Kvasnička J.** Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2003; 299 strán.
6. **Salaj P.** Laboratorní hodnocení funkce krevných destiček. In: Vojáček J, Malý M, et al. Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2004; 191–196.
7. **Thiagarajan P, Wu KK.** In vitro assays for evaluating platelet function. In: Gesele P, Page C, Fuster V, Vermylen J. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. First edition. Cambridge, Cambridge University Press, 2002; 459–470.
8. **Michelson AD.** Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation* 2004; 110: 489–493.
9. **Vojáček J, Malý M.** Funkce krevných destiček. In: Vojáček J, Malý M, et al. Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2004; 51–68.
10. [http://www.labtestonline.org/understanding/analytes/platelet\\_function/glance.html](http://www.labtestonline.org/understanding/analytes/platelet_function/glance.html). 31.3.2007.
11. **Fricke W, Kouides P, Kessler C, et al.** A multicenter clinical evaluation of the Clot Signature Analyser. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 763–768.
12. **Johns CS.** Platelet function testing. *Clinical Hemostasis Review* 2004; 18: 1–9.
13. **Meško D, Pullmann R, Nosáľová G, et al.** Vademékum klinickej biochémie. 1. vyd. Martin, Osveta, 1998; 1647 strán.
14. **Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, et al.** Rapid platelet function assay. An automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999; 99: 620–625.
15. **Osende J, Fuster V, Lev EI, et al.** Testing platelet activation with a shear-dependent platelet function test versus aggregation-based tests. *Circulation* 2001; 103: 1488–1491.
16. **Galajda P, Mokáň M.** Poruchy hemostázy pri diabetes mellitus. 1. vyd. Martin, PROKONZULT, 2001; 255 strán.
17. **Kubisz P, et al.** Hematológia a transfuziológia. 1. vyd. Bratislava, Praha, Grada Publishing, 2006; 323 strán.
18. **Hankey JH, Eikelboom JW.** Aspirin resistance. *BMJ* 2004; 328: 477–479.
19. **Wiviott SD, Antmann EM.** Clopidogrel resistance. New chapter

- in fast-moving story. *Circulation* 2004; 109: 3064–3067.
20. **Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, et al.** Platelet-Active drugs: The relationships among dose, effectiveness, and side effects. The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest* 2004; 126: 234S–264S.

MUDr. Ivan Varga  
 Kardiologická klinika  
 Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a. s.  
 Pod Krásnou hôrkou 1  
 833 48 Bratislava 37  
 e-mail: ivan\_varga@stonline.sk

## Vybrané odborné akce v roce 2008

### ČESKÁ REPUBLIKA

10. 4.–11. 4.	3. česko-německé pracovní dny	Praha
20. 4.–22. 4.	XX. celostátní konference laborantů a sester Špindlhorky 2008	Špindlerův Mlýn
28. 5.–31. 5.	XXII. olomoucké hematologické dny	Olomouc
5. 9.–6. 9.	IX. česko-slovenská konference laboratorní hematologie	Špindlerův Mlýn
6. 9.–9. 9.	XV. česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd	Špindlerův Mlýn
25. 9.	Střešovický transfuzní den	Praha
23. 10.	Pražský hematologický den Experimentální a klinická hematologie	Praha
5. 11.	III. brněnské hematologické dny Chronická lymfatická leukemie	Brno
6. 11.	III. brněnské hematologické dny Cyklus „Trombóza a krvácení – mezioborový problém“ – Koagulopatie a akutní medicína	Brno
21. 11.–23. 11.	XVIII. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR Dětská hematologie, dětská onkologie	Plzeň
Listopad	Perinatální imunohematologie a hemoterapie	Praha, Lékařský dům

### SLOVENSKÁ REPUBLIKA

25. 1.–26. 1.	XII. stretnutie detských hematológov, transfuziológov a onkológov	Bratislava
---------------	-------------------------------------------------------------------	------------

### DALŠÍ VYBRANÉ ZAHRANIČNÍ AKCE

3. 4.–4. 4.	9 <sup>th</sup> Annual NATA Symposium	Lisabon, Portugalsko
7. 6.–12. 6.	XXX <sup>th</sup> International Congress of the ISBT	Macao, Čína
12. 6.–15. 6.	13 <sup>th</sup> Congress of the EHA	Kodaň, Dánsko
4. 10.–7. 10.	61 <sup>th</sup> Annual Meeting AABB	Montreal, Kanada
6. 12.–9. 12.	50 <sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition	San Francisco, USA

*Bližší informace k jednotlivým akcím najdete na webových stránkách příslušných společností.*