

Význam nezralých trombocytů v kardiologii

Časná identifikace špatné odpovědi na antiagregační léčbu

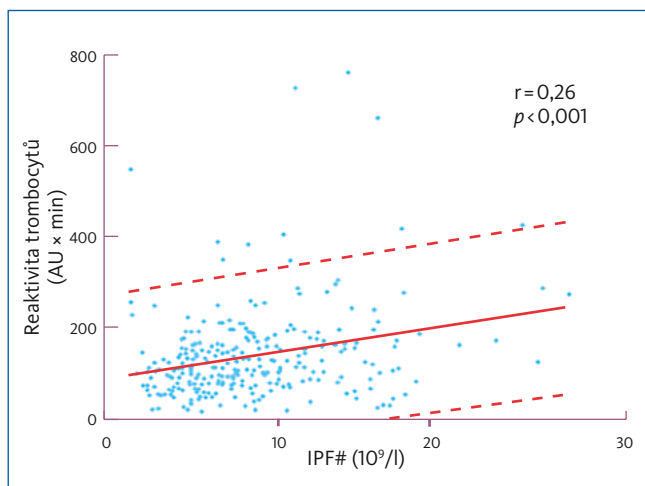
Trombocyty jsou důležité pro reparaci endoteliálních lézí. Po vasculárním poškození iniciují tvorbu trombu a regulují hojení ran. Jsou také důležité při tvorbě krevních sraženin a pomáhají redukovat průtok krve v oběhovém systému. Časná analýza aktivity trombocytů *in vivo* je důležitým ukazatelem rozvoje trombotických příhod. Tato analýza slouží u většiny pacientů také pro stanovení prognózy budoucích komplikací a pomáhá hodnotit účinnost antiagregační léčby.

Pacienti s akutními koronárními syndromy mají často vysokou hladinu nezralých trombocytů [1, 2], které tělo produkuje, aby kompenzovalo jejich spotřebu při agregačních procesech u aterosklerózy. Bylo zjištěno, že nezralé formy trombocytů hrají důležitou roli při hodnocení rizik a sledování léčby koronárních onemocnění. Koncentrace nezralých trombocytů (IPF#) je nový diagnostický parametr, jehož hodnota specificky odráží absolutní počet nově produkovaných trombocytů v periferní krvi.

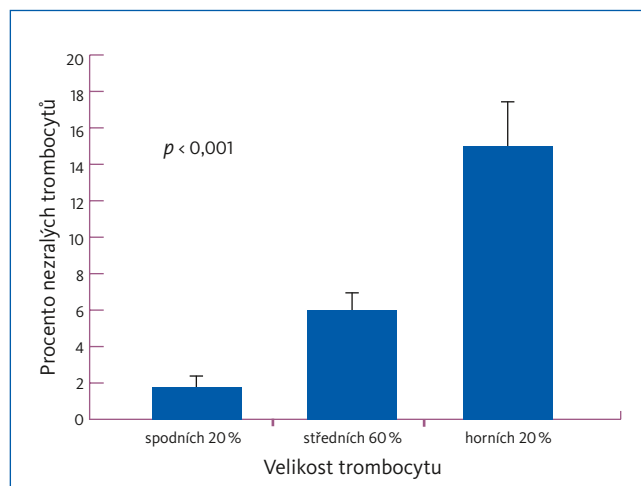
Nezralé trombocyty jsou reaktivnější než zralé a mají zvýšený protrombotický potenciál

Mladší nezralé trombocyty s vyšší denzitou a zbytkovým obsahem DNA (historicky nazývané retikulované trombocyty) jsou více reaktivní, produkují a uvolňují více trombogenních substancí (například tromboxan TX) a mohou exprimovat více specifických povrchových receptorů (například glykoproteiny GPIIb/IIIa, P-selektin (CD62P)), které jsou důležitými markery aktivace trombocytů. Vyšší protrombotický potenciál nezralých trombocytů ve srovnání se zralými byl již dokumentován v několika publikacích [3–6].

Studie autorů Stratz *et al.* (2016) ukázala, že pacienti s vyššími hladinami IPF prokazovali vyšší reaktivitu trombocytů. Byla zjištěna významná korelace mezi hladinou nezralých trombocytů a adenosindifosfátem indukovanou reaktivitou trombocytů (obr.1) [5].



Obr. 1 Korelace mezi hladinou nezralých trombocytů (IPF#) a reaktivitou trombocytů. Převzato od Stratz et al. [5].

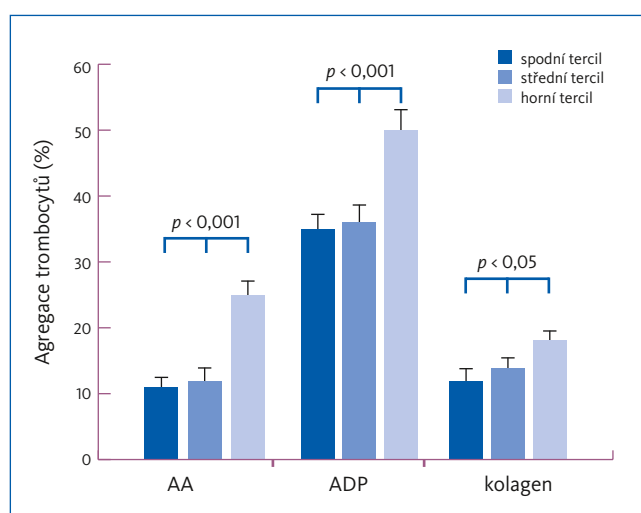


Obr. 2 Procento nezralých trombocytů ve skupinách dolních 20 %, středních 60 % a horních 20 %. Převzato od Guthikonda et al. [6].

Studie autorů Guthikonda et al. (2008) zjistila, že podíl nezralých trombocytů v oběhu silně koreluje s aktivací a agregací trombocytů. Devadesát pacientů bylo rozděleno do tercílů podle velikosti trombocytů a poměru nezralých trombocytů určeného imunofenotypizací. Vyšší procento nezralých trombocytů bylo nalezeno ve skupině pacientů s velkými trombocyty (horních 20 %), v porovnání se skupinou s malými trombocyty (spodních 20 %; 15,4 % proti 1,7 %, obr. 2). Ve skupině „velkých trombocytů“ byla v porovnání se skupinou „malých trombocytů“ nalezena také vyšší exprese jak GPIIb/IIIa (5,7 oproti 2,1), tak P-selektinu (7,8 oproti 4,6). Agregace trombocytů měřená metodou LTA (light transmission aggregometry) při reakci na 5- μ mol/l adenosin difosfát (ADP), 1,5-mmol/l kyseliny arachidonovou (AA) nebo 1- μ g/ml kolagen byla v horním tercilu významně vyšší v porovnání jak se středním, tak se spodním tercilem (obr. 3) [6].

Hladina nezralých trombocytů je prediktorem úspěšné antiagregační léčby

Ischemická choroba srdeční a akutní koronární syndromy (ACS) jsou v západním světě nejčastějšími příčinami smrti. ACS jsou způsobeny tvorbou trombu v místě aterosklerotického plátu v koronárních tepnách, které způsobují okluzi koronárního oběhu krve. I když jsou prováděny výzkumy nových terapií aterosklerózy, inhibice trombocytů zůstává základním kamenem léčby ACS, protože existuje řada klinických důkazů o tom, že antiagregační léky snižují kardiovaskulární rizika. Aspirin, samotný nebo v kombinaci s inhibitory P2Y₁₂ (duální antiagregační léčba), je základem léčby a sekundární prevence ACS. Antiagregační léky jsou základním preventivním nástrojem léčby pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Řada studií ukázala variabilitu reakce v odpovědi na léčbu aspirinem u jednotlivých pacientů. Zdá se, že podávání aspirinu jednou denně je pro některé pacienty nedostatečné



Obr. 3 Agregace trombocytů v reakci na kyselinu arachidonovou (AA), adenosindifosfát (ADP) a kolagen. Tercily podle velikosti trombocytů. Jak bylo popsáno výše, horní tercii odráží vysokou koncentraci nezralých trombocytů. Převzato od Guthikonda et al. [6].

[7], protože funkce destiček a syntéza tromboxanu A₂ se během 24 hodin mezi jednotlivými dávkami stačí obnovit [7–9]. Rizikové pacienti (například diabetici), pacienti se silnou aterosklerózou nebo vysokým obratem trombocytů mohou vyžadovat jiný režim antiagregační léčby, aby jim tato léčba vůbec přinášela prospěch [8, 10–12]. Zvýšená hladina nezralých trombocytů byla označena za klíčový faktor spojený s nedostatečnou inhibicí aktivity trombocytů v odpovědi na léčbu aspirinem, klopidogrelem a prasugrelem [7, 13–16].

Nezralé trombocyty jsou více rezistentní na funkční inhibici aspirinem a antagonisty receptorů P2Y₁₂.

Aspirin má 170 × vyšší inhibiční potenciál vůči COX-1 než COX-2. Ukázalo se, že jedním z možných vysvětlení rezistence vůči aspirinu je reziduální tvorba tromboxanu prostřednictvím trombocytárního COX-2. Nově vznikající trombocyty produkují COX-2 [18]. To znamená, že za podmínek spojených se zvýšeným obratem trombocytů vytváří velké množství nezralých trombocytů zvýšené koncentrace COX-2, které mohou být dostatečné pro tvorbu detekovatelných koncentrací tromboxanu, navzdory léčbě aspirinem. Několik studií také prokázalo, že pacientům se zvýšenou hladinou nezralých trombocytů byla naměřena vyšší reziduální reaktivita trombocytů v porovnání s pacienty s fyziologickou hladinou nezralých trombocytů [6–7, 10, 13].

Studie autorů Guthikonda *et al.* (2007) hodnotila úlohu nezralých trombocytů v antiagregačních účincích aspirinu. Reakce trombocytů před a 24 hodin po podání jedné dávky 325 mg aspirinu byla sledována na šedesáti zdravých dobrovolnících. Subjekty byly rozděleny do tercílů podle podílu nezralých trombocytů stanovených z plné krve imunofenotypizací. Bylo zjištěno, že hladina nezralých trombocytů je spojena se sníženým antiagregačním účinkem aspirinu a zvýšenou rezistencí na aspirin z důvodu zvýšené reaktivity a neúspěšné inhibice aktivity COX-1 a COX-2. Výskyt rezistence vůči aspirinu byl významně vyšší v horním tercilu (45 %) v porovnání se spodním tercilem (5 %) [13].

Potenciálně zajímavým důsledkem zjištění sníženého účinku aspirinu u pacientů s vysokým obratem destiček bylo, že pro tyto pacienty může být účinnější kratší interval dávkování aspirinu, protože přítomnost dávky aspirinu, který má krátký poločas, může působit proti reaktivitě nezralých destiček. Pascale *et al.* (2012) došli k závěru, že zvýšená megakaryopoéza je vysvětlením kratšího antiagregačního účinku nízké dávky aspirinu z důvodu rychlejší obnovy COX-1 a COX-2 destiček. Zhoršenou inhibicí aktivity destiček lze řešit úpravou intervalu dávkování aspirinu lépe, než zvýšením dávky [14]. Tito autoři zjistili, že dávkování aspirinu dvakrát denně snížilo resistenci vůči aspirinu v porovnání s podáním jednou denně.

Autoři Grove *et al.* (2011) zkoumali vliv obratu trombocytů na antiagregační účinky aspirinu u pacientů se stabilizovanou ischemickou chorobou srdeční (CAD). Obrat trombocytů byl hodnocen měřením hladiny nezralých trombocytů u 177 pacientů se stabilizovanou CAD na monoterapii aspirinem. Jak ukazuje tabulka 1, antiagregační účinek aspirinu byl snížen u pacientů s ischemií, kteří měli zvýšenou hodnotu IPF# [10].

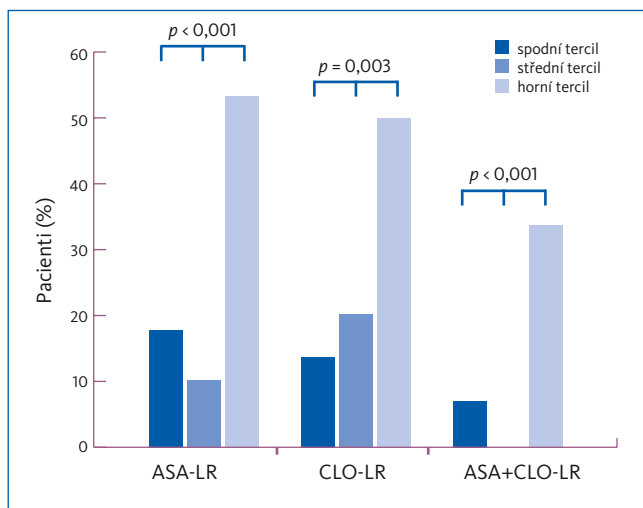
Hladina nezralých trombocytů (IPF#) je biomarkerem reziduální reaktivity trombocytů a prediktorem účinnosti antiagregační léčby.

Tabulka 1 Antiagregační účinek aspirinu byl snížen u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a zvýšenou hodnotou IPF#. AA = kyselina arachidonová; ADP = adenosindifosfát; RPR = reziduální reaktivita trombocytů. Převzato od Grove *et al.* [10].

AA 1,0 mM	bez RPR (n = 58)	+ RPR (n = 58)	p-hodnota
PLT (10 ⁹ /l)	205 (186–234)	254 (237–305)	< 0,0001
MPV (fl)	10,8±0,9	11,0±0,8	0,038
IPF (%)	3,0 (2,0–4,2)	3,4 (2,3–4,9)	0,256
IPF# (10 ⁹ /l)	6,0 (4,5–9,1)	8,4 (6,4–12,4)	< 0,001
Kolagen 1,0 µg/ml	bez RPR (n = 58)	+ RPR (n = 61)	
PLT (10 ⁹ /l)	194 (178–234)	250 (219–309)	< 0,0001
MPV (fl)	10,8±0,8	11,1±0,9	0,055
IPF (%)	3,1 (2,1–4,3)	3,4 (2,5–4,8)	0,207
IPF# (10 ⁹ /l)	6,1 (4,6–8,1)	8,4 (6,1–13,5)	< 0,0001
ADP 10 µM	bez RPR (n = 58)	+ RPR (n = 61)	
PLT (10 ⁹ /l)	194 (176–215)	262 (234–320)	< 0,0001
MPV (fl)	10,9±0,8	11,0±1,0	0,746
IPF (%)	2,8 (2,2–4,2)	3,4 (2,0–4,8)	0,579
IPF# (10 ⁹ /l)	5,6 (4,5–7,0)	8,4 (5,8–13,6)	< 0,0001
VerifyNow® Aspirin	bez RPR (n = 59)	+ RPR (n = 58)	
PLT (10 ⁹ /l)	214 (192–267)	238 (208–283)	0,055
MPV (fl)	11,0±0,9	11,0±0,9	0,860
IPF (%)	3,0 (2,1–4,3)	3,4 (2,5–4,7)	0,245
IPF# (10 ⁹ /l)	6,6 (5,0–8,9)	8,2 (5,4–11,7)	0,060

Trombóza stentu je nebezpečnou komplikací zavedení stentu do koronárních tepen. Studie autorů Wurtz *et al.* (2010) zahrnující 117 pacientů po perkutánní koronární intervenci zjistila, že u pacientů s předchozí trombózou stentu byl antiagregační účinek aspirinu snížen z důvodu vyšší reziduální agregace trombocytů [7].

Studie autorů Guthikonda *et al.* (2008) prokázala, že podíl nezralých trombocytů v krevním oběhu silně koreluje s odpovědí na antiagregační léčbu pacientů se stabilizovanou ischemickou chorobou srdeční. 90 pacientů bylo rozděleno do tercílů podle hladiny nezralých trombocytů (%) stanovené imunofenotypizací. Jak ukazuje obrázek 4, četnost snížené odpovědi na aspirin byla významně vyšší v horním tercilu (53 %) v porovnání s prostředním (10 %) a spodním (17 %) tercilem. Také četnost nedostatečné odpovědi na klopidogrel byla vyšší v horním tercilu (50 %) ve srovnání s ostatními dvěma (20 % ve středním a 13 % ve spodním tercilu) (obr. 4) [6].



Obr. 4 Procento pacientů s nedostatečnou odpovědí na aspirin (ASA-LR), klopidogrel (CLO-LR) a duální léčbu aspirinem a klopidogrelem (ASA+CLO-LR) podle tercílů na základě hladin nezralých trombocytů. Převzato od Guthikonda et al. [6].

Pro určení vlivu nezralých trombocytů na antiagregační účinek klopidogrelu vyhodnotili autoři Ibrahim *et al.* (2012) 29 zdravých dobrovolníků před a jeden týden po podání denní dávky 75 mg klopidogrelu. Tito dobrovolníci byli rozděleni do tercílů podle hladiny nezralých trombocytů stanovených imunofenotypizací. Vyšší procento pacientů s nedostatečnou odpovědí na 5 μ M ADP po klopidogrelu bylo zjištěno v horním tercílu podle hladiny nezralých trombocytů v porovnání se spodním tercílem (54 % oproti 23 %) [15].

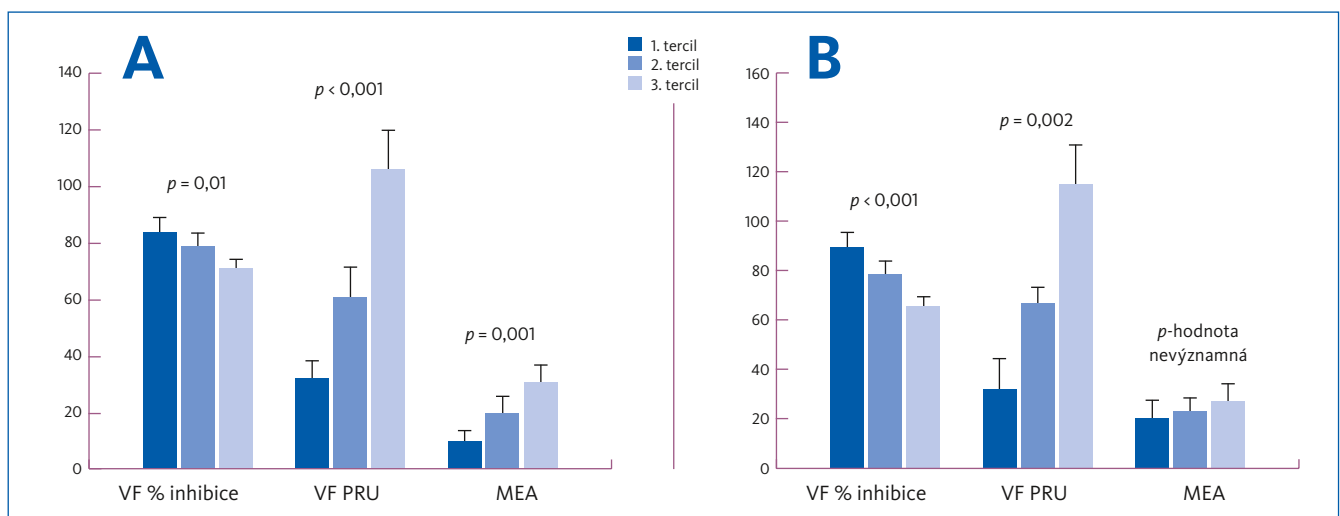
Cílem studie autorů Perl *et al.* (2014) bylo určit, zda je odpověď na prasugrel spojena s podílem cirkulujících nezralých trombocytů v krevním oběhu u pacientů s infarktem myokardu s elevací segmentu ST (STEMI). Do studie bylo zařazeno 62 pacientů.

V rané fázi studie hladiny nezralých cirkulujících trombocytů stanovených imunofenotypizací silně korelovaly s reaktivitou trombocytů, která byla stanovena analýzou P2Y₁₂ a impedanční agregometrií (Multiplate). U pacientů v horním tercílu podle počtu nezralých trombocytů byla zjištěna vyšší reaktivita trombocytů než ve středním a spodním tercílu. Podobné výsledky se zjištěním významných korelací mezi hladinou nezralých trombocytů a reaktivitou trombocytů byly zaznamenány 30 dní po primární percutánní intervenci (obr. 5) [16].

V nedávné době bylo publikováno několik dalších studií, které ukazují podobně vysokou korelaci agregace trombocytů se zvýšenými hodnotami IPF nebo IPF# u pacientů s ischemickou chorobou srdeční léčených ticagrelomem, prasugrelem nebo duální antiagregační léčbou [4, 17–18].

Zvýšený počet nezralých trombocytů je spojen s rizikem výskytu nežádoucích kardiovaskulárních příhod

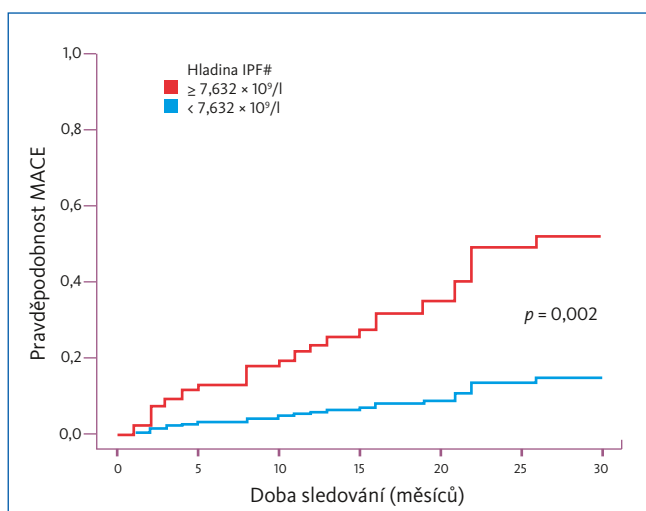
Mezi hlavní příčiny arteriální trombózy patří narušení průtoku krve, poškození endoteliálních buněk a hyperkoagulace. Tyto faktory mohou také přispět k přechodu stabilizované CAD na ACS. Významným základním mechanismem těchto chorob je ateroskleróza. Trombocyty jsou klíčovými elementy u ACS, protože tvoří hlavní složku trombů u pacientů s ACS. Při vzniku trombů se spotřebuje velké množství trombocytů. Následný nedostatek trombocytů je kompenzován jejich zvýšenou produkcí, a proto jsou v periferní krvi nalézány vyšší počty nezralých trombocytů. Několik autorů uvádí spojitost mezi zvýšenou hladinou nebo počtem nezralých trombocytů a zvýšeným rizikem závažných kardiovaskulárních příhod [1–2, 19–21].



Obr. 5 Hodnocení reaktivity trombocytů podle tercílů počtu nezralých destiček bylo provedeno srovnáním všech tří tercílů 2–4 dny po percutánní intervenci (A) a po 30 dnech po ní (B). VF: VerifyNow P2Y₁₂ stanovení funkce trombocytů; PRU: P2Y₁₂ reakční jednotky; MEA: impedanční agregometrie. Převzato od Perl et al. [16].

Tabulka 2 V tercilu s vysokou hodnotou IPF# byl zjištěn vyšší počet závažných kardiovaskulárních příhod než v prostředním a spodním tercilu. Převzato od Ibrahim et al. [22].

	Celkem (n = 89)	Tercily IPF# ($10^9/l$)			p-hodnota
		Spodní (1,364–5,836) (n = 30)	Střední (5,836–9,272) (n = 29)	Horní (9,272–27,520) (n=30)	
exitus	10 (11,2)	1 (3,3)	3 (10,3)	6 (20)	0,047
NSTEMI	11 (12,4)	1 (3,3)	3 (10,3)	7 (23,3)	0,023
hospitalizace pro anginu pectoris	7 (7,9)	2 (6,7)	1 (3,4)	4 (13,3)	0,175
revaskularizace	6 (6,7)	1 (3,3)	1 (3,4)	4 (13,3)	0,116
MACE (kombinovaný)	30 (33,7)	5 (16,7)	7 (24,1)	18 (60)	< 0,001



Obr. 6 Hladina IPF# $\geq 7,632 \times 10^9/l$ byla spojena se zvýšeným rizikem závažné kardiovaskulární příhody. Převzato od Ibrahim et al. [22].

Výsledky publikované autory Ibrahim *et al.* (2014) uvádějí silnou vazbu mezi hodnotami IPF# a výskytem závažných kardiovaskulárních příhod (MACE) [22]. V prospektivní studii skupiny pacientů s ischemickou chorobou srdeční (CAD) byli pacienti sledováni z hlediska výsledného výskytu všech druhů MACE, definovaného jako kombinace všech důsledků včetně smrti, infarktu myokardu, neplánované revaskularizace, nebo hospitalizace pro anginu pectoris. Sledováno bylo 89 pacientů s průměrnou dobou sledování 31 měsíců. Rozdělení na tercily podle hodnoty IPF# ukázalo, že nejvyšší počet MACE se vyskytl v horním tercilu ve srovnání se středním a spodním tercilem (60 % oproti 24 % a 17 %) (tabulka 2). Časově závislá charakteristika výsledků analýzy ukázala, že hladina IPF# $\geq 7,632 \times 10^9/l$ měla senzitivitu pro MACE 70,7 % a specifitu pro MACE 82,1 %. U pacientů s hladinou IPF# $\geq 7,632 \times 10^9/l$ byla vyšší pravděpodobnost výskytu MACE (poměr pravděpodobnosti: 4,65) (obr. 6).

Závěr a klinická interpretace

Hodnocení účinnosti farmakologické antiagregační léčby a prognóza budoucích možných kardiovaskulárních komplikací jsou pro řadu pacientů velmi důležité. Nezralé trombocyty jsou v porovnání se zralými reaktivnější a jejich protrombotický potenciál je vyšší. Spotřeba trombocytů při tvorbě trombu je kompenzována vyplavováním nezralých trombocytů s vyšším agregačním potenciálem. Zvýšená reaktivita nezralých trombocytů redukuje účinnost antiagregačních preparátů.

Stanovení počtu nezralých trombocytů (IPF#) je nový hematologický diagnostický parametr, který je k dispozici v rámci rutinního laboratorního testu při vyšetření krevního obrazu. Hodnota IPF# je biomarkerem pro hodnocení antiagregační léčby z důvodu reziduální reaktivity mladých trombocytů a má lepší prediktivní hodnotu ve srovnání s tradičními funkčními testy trombocytů [23]. Hodnota počtu nezralých trombocytů může být použita pro stanovení rizika kardiovaskulárních příhod.

Literatura

- [1] **Grove et al.** (2009): Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost.* 101(1):151–6.
- [2] **Lakkis et al.** (2004): Reticulated platelets in acute coronary syndrome: a marker of platelet activity. *J Am Coll Cardiol.* 44(10):2091–3.
- [3] **McBane et al.** (2014): Propensity for young reticulated platelet recruitment into arterial thrombi. *J Thromb Thrombolysis.* 37(2):148–54.
- [4] **Bernlochner et al.** (2015): Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J.* 36(45):3202–10.
- [5] **Stratz et al.** (2016): Comparison of Immature Platelet Count to Established Predictors of Platelet Reactivity During Thienopyridine Therapy. *J Am Coll Cardiol.* 68(3):286–93.
- [6] **Guthikonda et al.** (2008): Role of reticulated platelets and platelet size heterogeneity on platelet activity after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 52(9):743–9.
- [7] **Wurtz M et al.** (2014): 24-hour antiplatelet effect of aspirin in patients with previous definite stent thrombosis. *Int J Cardiol.* 175:274–9.
- [8] **Henry P et al.** (2011): 24-hour time-dependent aspirin efficacy in patients with stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 105:336–44.
- [9] **Christensen KH et al.** (2014): Reduced antiplatelet effect of aspirin during 24 hours in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes. *Platelets.* 26:230–5.
- [10] **Grove EL et al.** (2011): Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost.* 9:185–91.
- [11] **Capodanno D et al.** (2011): Pharmacodynamic effects of different aspirin dosing regimens in type 2 diabetes mellitus patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Interv.* 4:180–7.
- [12] **Grove EL et al.** (2014): Can we improve the efficacy of low-dose aspirin? *Thromb Haemost.* 112:1077–8.
- [13] **Guthikonda et al.** (2007): Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost.* 5(3):490–6.
- [14] **Pascale et al.** (2012): Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood.* 119(15):3595–603.
- [15] **Ibrahim et al.** (2012): Immature platelet fraction (IPF) determined with an automated method predicts clopidogrel hyporesponsiveness. *J Thromb Thrombolysis.* 33(2):137–42.
- [16] **Perl et al.** (2014): Response to prasugrel and levels of circulating reticulated platelets in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 63(6):513–7.
- [17] **Cesari et al.** (2008): Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost.* 99(5):930–5.
- [18] **Baaten et al.** (2015): Gradual increase in thrombogenicity of juvenile platelets formed upon offset of prasugrel medication. *Haematologica.* 100(9):1131–8.
- [19] **Grove et al.** (2011): Increased platelet turnover in patients with previous definite stent thrombosis. *J Thromb Haemost.* 9(7):1418–9.
- [20] **Cesari et al.** (2013): Reticulated platelets predict cardiovascular death in acute coronary syndrome patients. Insights from the AMI-Florence 2 Study. *Thromb Haemost.* 109(5):846–53.
- [21] **Lopez-Jimenez et al.** (2013): Immature platelet fraction: a new prognostic marker in acute coronary syndrome. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 66(2):147–8.
- [22] **Ibrahim et al.** (2014): Association of immature platelets with adverse cardiovascular outcomes. *J Am Coll Cardiol.* 64(20):2122–9.
- [23] **Freyenhofer et al.** (2015): Antiplatelet drugs in patients with enhanced platelet turnover: biomarkers versus platelet function testing. *Thromb Haemost.* 114(3):459–68.

Volně přístupné Sysmex White Papers s dalšími tématy naleznete na:

www.sysmex.cz/whitepapers