

Metabolické a aktivační děje v krevních destičkách a možnosti jejich inhibice

M. Pecka, J. Malý

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, a Katedra interních oborů Lékařské fakulty UK Hradec Králové, přednosta prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Souhrn: V krevních destičkách po jejich aktivaci probíhá řada aktivačních pochodů, konfirmačních a metabolických změn. Toto sdělení se zabývá některými aktivačními kroky krevních destiček a popisuje jednotlivé děje, které na těchto úrovních probíhají. Současné jsou popsána místa, ve kterých lze aktivně do metabolismu nebo aktivačních dějů krevní destičky účinně zasáhnout. Protideštičková léčba se zaměřuje na tyto oblasti a je snaha nalézt účinné látky, které omezují přístup k určitému receptoru nebo místu, případně inhibují enzymy, které se těchto dějů zúčastní.

Klíčová slova: krevní destička – aktivace – adheze – agregace – inhibice – blokáce – protideštičková léčba

Blood platelets metabolic and activation processes and options for their inhibition

Summary: A range of activation processes and confirmatory and metabolic changes take place in blood platelets following their activation. The paper discusses some of the blood platelet activation steps and describes the specific processes that take place on this level. Furthermore, the points at which it is possible to actively interfere with the blood platelet metabolism or activation processes are described. Antiplatelet treatment focuses on these points and there are efforts to identify active substances that either inhibit access to certain receptors or targets or, alternatively, inhibit the enzymes participating in these processes.

Key words: blood platelet – activation – adhesion – aggregation – inhibition – blockade – antiplatelet treatment

Úvod

Protideštičková léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček [1]. Aktivace krevních destiček nabízí vzhledem k počtu zúčastněných faktorů několik úrovní, ve kterých je možno farmakologicky zasáhnout a léčbu je možné kombinovat.

Trombocyty je možné inhibovat ve fázi adheze, aktivace nebo agregace, popř. můžeme posilovat jejich stabilitu:

- **blokádu adheze krevních destiček na subendotelové struktury:**
 - inhibitory adhezního glykoproteinu krevních destiček (GP Ib/IIa)
 - antagonisty von Willebrandova faktoru (vWF)
- **blokádu aktivačních cest a cyklů:**
 - inhibitory COX (cyklus kyseliny arachidonové) a inhibitory receptorů tromboxanu A₂ (TXA₂) a tromboxansyntázy
 - inhibitory membránových receptorů krevních destiček (selektivní receptory: adenosindifosfátu –

ADP a trombinu – PAR 1 a komplexní receptory)

• ovlivněním metabolických působků krevních destiček:

- zvýšení metabolických působků krevní destičky – cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a guanosinmonofosfátu (cGMP)

• blokádu agregace krevních destiček:

- blokátory GP IIb/IIIa (fragmenty monoklonálních protilátek, syntetické peptidové a nepeptidové inhibitory blokující glykoproteinový komplex GP IIb/IIIa)
- inhibitory genyze trombinu

Blokáda adheze krevních destiček na subendotelové struktury

Aktivace trombocytů kolagenem může být zprostředkována 3 různými interakcemi:

- **GP Ib** prostřednictvím vWF (GP Ib/IX/V)
- **integrinem $\alpha 2\beta 1$ (GP Ia/IIb)**
- **GP VI** – úloha tohoto glykoproteinu při zprostředkování adheze je nejméně prozkoumána

Vnitřní vrstvy stěny větších cév, tvořené elastinem, svalovými buňkami, subendoteliálními mikrofibrilami a kolagenem, vážou velmi rychle krevní destičky. Kolageny hrají úlohu při vyvolání aktivace trombocytů, jejich adhezi (monomerní a fibrilární struktury), agregaci tripletní helikální struktury) a při nastartování reparačních pochodů. V cévní stěně se nachází kolageny: I, III–VI, VIII, XII–XIV – účinným aktivátorem agregace je kolagen III. Vazba destiček na kolagenní vlákna probíhá ve 2 fázích jako:

- **iniciační adheze** – zprostředkována vWF a komplexem GP Ib/V/IX
- **pevná adheze** – zajištěna vazbou GP Ia/IIb na kolagen

K zablokování iniciační fáze adheze se využívá těchto blokátorů:

- **antagonisté vWF:** používají se **nefunkční fragmenty vWF**, které obsazují vazebná místa pro vWF na membráně krevní destičky (blokuje se vazebné místo na GP Ib); dochází ke snížení

adhezních schopností krevní destičky zprostředkované touto cestou, a tím i k zablokování její následné aktivace

- **blokátoři GP Ib/IIa:** zkouší se zablokování této cesty **kyselinou aurinkarboxylovou** či heterogenní směsí **polykarboxylových polymerů**, nebo se využívá **proteinů izolovaných z jedu *Bothrops jararaca***

Blokáda na tomto místě znemožní vazbu receptorů krevních destiček na obnažená kolagenní vlákna, a tím zabráni jejich adhezi, další aktivaci a agregaci.

Blokáda aktivačních cest a cyklů

Aktivace krevních destiček je složitý regulovaný proces. Dochází k ní dvěma cestami:

- **aktivací adhezaních destiček**
- **aktivací klidových destiček v plazmě působením induktorů**

Během několika sekund po poškození cévy dochází k nasměrování a následné adhezi krevních destiček k poškozené cévní stěně. Krevní destičky se přitom aktivují a dochází k uvolnění proagregačních působků. V průběhu aktivace trombocytu dochází k těmto změnám krevní destičky [2]:

- **k přesunům nitrobuněčného vápníku** (uvnitř buňky se zvýší koncentrace volných iontů Ca^{2+})
Po navázání ligandu na receptor nebo navázáním adhezních receptorů na subendotel dochází k:
 - přenosu signálu do destičky
 - mobilizaci nitrobuněčného Ca^{2+} z denzního tabulárního systému (DTS)
 - případně k otevření výměníků – influx Ca^{2+} do buňky
- **ke změnám membránové struktury:**
 - fenomén flip – flop, přetočení membrány
 - poškození membrány s následnou tvorbou membránových mikročástic (microvesicle)

Oba děje vedou k odhalení membránových fosfolipidů vnitřních struk-

tur membrány (PS – fosfatidylserin, PE – fosfatidyletanolamin).

vWF se váže k vazebným místům na kolagenu. V další fázi se naváže GP VI, který vyšle signál k aktivaci $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Dochází ke stabilizaci adheze, sekreci a další aktivaci [3]. Vyvolá se:

- **konfirmační změna GP IIb/IIIa**
Po stimulaci destiček a po uvolnění Ca^{2+} se glykoproteinové složky aktivují, dojde ke konfirmační změně, při které vzniká komplex receptorů Gp IIb/IIIa – vytvoří se podmínky pro vazbu fibrinogenu.

Na membráně klidových destiček je $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ve skloněné konfirmaci a místo, na které se váže ligand, není přístupné. Následná aktivace destičky agonisty, jako je trombin, ADP či kolagen, vybudí intracelulární signál. Signál vyvolá navázání talinu k β_3 cytoplazmatickému zakončení. Dojde k oddělení β_3 od αIIb zakončení, což vede následně k narovnání konfirmace $\alpha\text{IIb}\beta_3$ v extracelulární oblasti a k otevření vazebného místa pro ligand (fibrinogenu, vWillebrandova faktoru).

- **sekrece obsahu granulí**
Při konfirmační změně dochází k ovlivnění membránové fluidity. To vyvolá intracelulární signál prostřednictvím proteinu 38 (p38) a TCP-1, který způsobí změnu tvaru destičky a uvolnění obsahu α granulí a při silnějším podnětu i denzních granulí. Přes kanálový systém je vypuzován obsah granulí z buňky ven. Předpokládá se, že membrána granulí splyne s membránou kanálového systému [4].
- **syntéza tromboxanu A_2 (TXA_2)**
Prostaglandiny mohou ovlivnit funkce trombocytu. Tvoří se v procesech, při kterých se arachidonová kyselina (AA) uvolňuje z membránových fosfolipidů deacylací fosfolipázami (fosfolipáza A_2). Nejprve dochází ke konverzi AA v přítomnosti cyklooxygenázy (COX) na endoperoxidy (prostaglandiny G_2 – PGG_2 a H_2 – PGH_2). PGH_2 je následně za účasti specifických syntáz přeměněn na PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , prostacyklin a TXA_2 [5].

Blokáda enzymů cyklu kyseliny arachidonové (tvorba TXA_2)

Blokace acetylsalicylovou kyselinou (ASA)

Již Hippokrates používal 400 let před Kristem jako analgetikum a antipyretikum odvar z vrbové kůry, která obsahuje salicin – název odvozen od latinského názvu vrby – Salix [6]. Italský chemik Raffael Piria vyluhoval z extraktu vrbové kůry kyselinu salicylovou [7]. V roce 1897 syntetizoval Felix Hoffmann kyselinu acetylsalicylovou [8]. Vliv acetylsalicylové kyseliny na krevní destičky publikoval v roce 1967 Morris.

Protideštičkový účinek ASA je dán interferencí s biosyntézou cyklických prostanooidů v cyklu kyseliny arachidonové [9]. ASA vyvolá nevratnou inhibici cyklooxygenázy a následné potlačení syntézy tromboxanu A_2 a dalších prostaglandinů [10]. ASA je poměrně rychle deacetylována játry – plazmatický poločas je asi 20 min.

V roce 1991 byly zjištěny 2 izoformy cyklooxygenázy: COX-1 a COX-2 [8]. COX-1 se nachází v krevních destičkách, kdežto COX-2 hlavně v monocytech a makrofázích, ve kterých se tvoří „de novo“. COX-1 vzniká expresí genu o velikosti 22 kB na chromozomu 2 nebo 9, kdežto COX-2 je kódován genem o velikosti 8,3 kB lokalizovaným na chromozomu 1. Bílkovinné řetězce mají stejnou molekulovou hmotnost (72 kDa) a vykazují 63% homologii v sekvenci aminokyselin [11].

Obě izoformy cyklooxygenázy jsou membránově vázané enzymy, které tvoří úzký a dlouhý hydrofobní kanál, do kterého vstupuje kyselina arachidonová uvolněná z poškozené membrány. Enzymy katalyzují přeměnu této kyseliny na prostaglandiny. ASA je 50–100krát účinnějším inhibitorem destičkové COX-1 než monocytární COX-2. Přestože plazmatický poločas ASA je poměrně krátký, stačí za tuto dobu inhibovat prakticky všechny destičky. Navíc se předpokládá, že ASA inaktivuje COX i v relativně zralých megakaryocytech, ve kterých jsou již přítomny zárodky krevních destič-

ček [9]. Inhibice je nevratná a vzhledem k tomu, že destičky nedokážou COX syntetizovat, přetrvává po celou dobu biologického života trombocytu (10–12 dní). V současné době se používá terapeutická dávka ASA v rozmezí 50–100 mg za den. Tato léčba by měla zajistit účinnou blokaci syntézy tromboxanu A_2 , aniž by současně blokovala endoteliální produkci PGI_2 .

Účinek ASA na krevní destičky a endotelové buňky:

- Irreversibilně **acetyluje cyklooxygenázu (COX-1)** v cyklu kyseliny arachidonové. Molekulární mechanismus této inhibice spočívá v blokádě COX kanálu v důsledku acetylace hydroxylové skupiny serinového rezidua v místě Ser⁵²⁹. Tím je zabráněno přístupu substrátu ke katalytickému místu enzymu [12].
- Irreversibilně inaktivuje COX-1 v **krevních destičkách**, tím zamezuje arachidonové kyselině vázat se částí své molekuly ke COX-1 [8].
- **Acetyluje COX-1 v endotelových buňkách**, a zamezuje tak následné konverzi arachidonové kyseliny na výrazné vazodilatátory, zejména na prostacyklin PGI_2 .

COX-1 (prostaglandin H-syntáza: PGHS-1) je exprimována mnoha tkáněmi a buňkami, zahrnující krevní destičky, endotelové buňky, buňky střevní sliznice a jiné.

Inhibiční vliv ASA k COX-1 je závislý na dávce. Jednorázová dávka 160 mg ASA nebo denní dávka 30–50 mg ASA po dobu 7–10 dnů by měla plně inhibovat destičkovou COX-1. Někteří nemocní kvůli přecitlivělosti nejsou schopni ASA nebo jiná nesteroidní antirevmatika užívat [13].

V některých zemích se využívá **inhibice triflusalem**, který podobně jako ASA blokuje cyklooxygenázu. Výhodou je, že inhibice je omezena na cyklooxygenázu krevních destiček a cyklooxygenáza endotelií není ovlivněna. Syntéza prostacyklinu je tak plně zachována.

Existuje fenomén, který se nazývá „**rezistence na ASA**“. O tomto jevu lze hovořit buď z klinického pohledu – jako o selhání protektivního účinku ASA před trombotickou komplikací, nebo ji lze definovat laboratorně – jako neschopnost způsobit in vitro prokazatelnou inhibici destičkových funkcí [14].

Blokace tromboxansyntetázy

Využívá se imidazolových přípravků (např. VAPIPROST nebo RIDOGREL). Jedná se o kombinované blokátory receptorů TXA_2 a tromboxansyntetázy.

Blokace membránových receptorů krevních destiček

Po navázání induktoru na receptor dochází k přenosu signálu do krevní destičky:

- ADP se váže ke svým receptorům na krevní destičce ($P2Y_1$ a $P2Y_{12}$) a tato vazba stimuluje Ga nebo $Gai2$ – spážené membránové proteiny, které vedou k aktivaci enzymatických a kontraktálních systému. To následně vede buď k primární, nebo sekundární agregaci krevních destiček [15].
- Trombinové receptory v lidských krevních destičkách PAR 1 a PAR 4 zprostředkují signalizaci nezávisle. PAR 1 vyžaduje nízkou a PAR 4 vysokou koncentraci trombinu. Trombin rozpoznává vnější část domény PAR 1 spáženou s G proteinem. Tato interakce trombinu probíhá jak v místě N – konce, tak i v místě C – zakončení receptoru. Trombin obě místa štěpí tak, že štěpí peptidickou vazbu mezi receptorovými místy Arg⁴¹ a Ser⁴² – tím se odkryje nový N – konec, který funguje jako vazebný ligand ukotvený intramolekulárně s tělem receptoru k vyvolání transmembránové signalizace [16].

Selektivní inhibitory

Receptory ADP: ADP je vylučován z denzních granul destiček a z aktivovaného cévního subendotelu (obr. 1).

Ticlopidin a clopidogrel jsou thienopyrimidinové deriváty, které ireverzibilně blokují receptory aktivace destiček pro ADP typu $P2Y_1$. Jiné cesty aktivace zůstávají neovlivněny. Destičky nemocných, kteří užívají tyto léky, nejsou schopné agregovat po stimulaci ADP, ale zachovávají si schopnost změny tvaru po přidání ADP. Blokáda receptorů $P2Y_1$ není schopna inhibovat všechny ADP receptory aktivace destiček. Je snaha najít inhibitory receptorů $P2Y_{AD}$ [17].

Receptory trombinu: Používají se:

- blokátory trombinových destičkových receptorů PAR-1: jejich účinek je založen na principu protilátek proti vlastnímu receptoru
- trombostatin – jedná se o degradační oligopeptidový produkt bradykininu o 5 aminokyselinách, který se váže přímo na aktivní místo receptoru

Komplexní inhibitory

Jsou léčiva s komplexním působením.

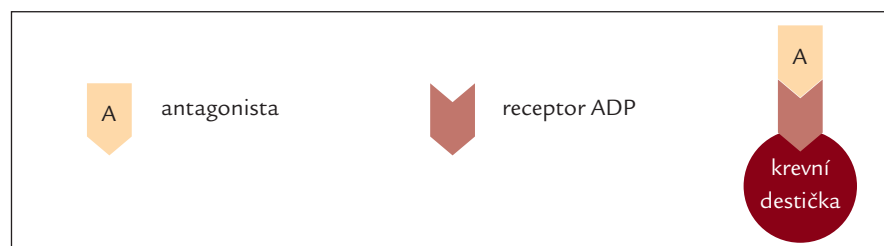
Anagrelid: inhibuje aktivaci po řadě podnětů (ADP, trombin, kyselina arachidonová, kolagen aj.). Po dlouhodobém podávání se může objevit trombocytopenie.

Ovlivnění metabolických působků krevních destiček

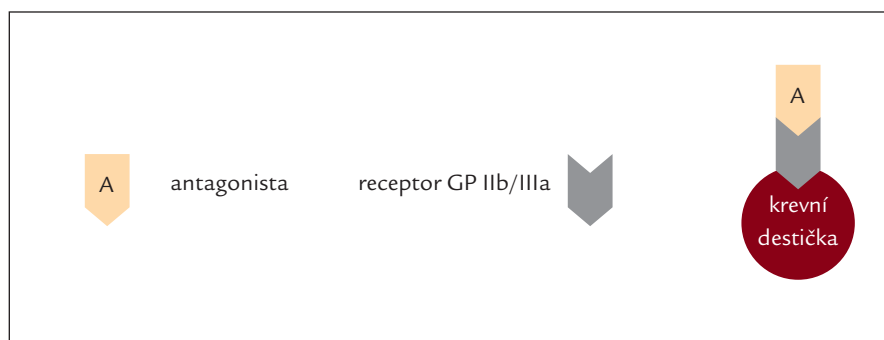
V této oblasti se hledají vhodné deriváty.

Blokáda agregace krevních destiček – blokátory GP IIb/IIIa Blokátory receptorů GP IIb/IIIa

Inhibitory glykoproteinového komplexu GP IIb/IIIa blokují agregaci destiček, která je vyvolána všemi agonisty.



Obr. 1. Blokace receptoru pro ADP.



Obr. 2. Blokace glykoproteinového komplexu GP IIb/IIIa.

Váží se buď přímo na receptorové místo glykoproteinového komplexu, nebo stericky brání vzájemnému propojení konformačně změněných glykoproteinových komplexů na dvou různých destičkách. Tím brání připojení fibrinogenu nebo vWF k receptoru GP IIb/III [4] (obr. 2).

Inhibitory na bázi monoklonální protilátky: Abciximab (chimerická myší/lidská monoklonální protilátka blokující nespecificky sterickou zábranou destičkový receptor GP IIb/IIIa). Abciximab blokuje i vitronectinový receptor ($\alpha_v\beta_3$) endotelií, buněk hladkého svalu a destiček a váže se i na $\alpha_u\beta_2$ (Mac-1) receptor monocytů, neutrofilů a NK buněk (natural killer cells).

Inhibitory s malou molekulou: Tyto látky napodobují RGD sekvenci aminokyseliny fibrinogenu a váží se specificky na receptor krevních destiček GP IIb/IIIa.

Rozlišujeme tyto nízkomolekulární látky:

- peptidové inhibitory: eptifibatid – cyklický heptapeptid odvozený z hadího jedu pygmejového chřestýše. Má nahrazen Lys za Arg. Jedná se tedy o sekvenci KGD, která napodobuje RGD sekvenci a váže se s vysokou afinitou na GP IIb/IIIa.
- nepeptidové inhibitory: tirofiban – nepeptidový derivát tyrosinu – a lamifiban.

Inhibitory GP receptorů jsou v současné době nejúčinnějšími protideštičkovými léky.

Inhibitory geneze trombinu

Nízkomolekulární hepariny – LMWH potencují účinek antitrombinu na aktivovaný faktor Xa, a tím snižují genezi trombinu. Aktivace destiček ostatními mechanismy zůstává zachována [18].

V současnosti dostupné protideštičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování. Indikace protideštičkové léčby vyplývá především z přítomnosti rizikových faktorů tepenné okluze [19].

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura

1. Badimon L, Badimon JJ. Interaction of platelet activation and coagulation. In: Fuster V, Topol EJ (eds). *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers 1996: 639–656.
2. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemostas* 2003; 1: 1602–1612.
3. Ruggeri Z. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120: 5–9.
4. Yap CL, Anderson KE, Hugan SC et al. Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin $\alpha IIb\beta III$. *Blood* 2002; 99: 151–158.

5. Gibbons JM. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 2004; 117: 3415–3425.

6. Dalen JE. An apple a day or an aspirin a day. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1066–1069.

7. McKee SA, Sane DC, Dellargyis EN. Aspirin resistance in cardiovascular diseases: A review of prevalence, mechanisms and clinical significance. *Thromb Haemost* 2002; 88: 711–715.

8. Samama MM, Elalamy I. Aspirine et hémostase. *Rev Méd Interne* 2000; 21: 27–34.

9. Awtry HA, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000; 101: 1206–1218.

10. Hilmerová J, Filipovský J. Klinický význam aspirinové rezistence. *Vnitř Lék* 2004; 50: 462–469.

11. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 a 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97–120.

12. Patrono C, Collier B, Dalen JE et al. Platelet-Active Drugs. The relationship among dose, effectiveness and side effects. *Chest* 2001; 119: 39–63.

13. Gollapudi RR, Teirstein PS, Stevenson DD et al. Aspirin sensitivity. Implications for Patients with coronary artery disease. *JAMA* 2004; 292: 3017–3023.

14. Altman R, Luciani HL, Muntaner J et al. The antithrombotic profile of Aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thromb Haemost* 2001; 2: 1.

15. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; 86: 222–232.

16. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 1999; 103: 879–887.

17. Gaspoz JM, Coxson PG, Goldman PA et al. Cost-effectiveness of aspirin, clopidogrel, or both for secondary prevention of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1800–1806.

18. Vojáček J. Inhibitory destičkových glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa. *Remedia* 2003; 13: 84–92.

19. Vojáček J, Malý M, Hraboš V et al. Hladina tkáňového faktoru, inhibitoru tkáňového faktoru a solubilního P-selektinu u nemocných s akutním koronárním syndromem. *Cor Vasa* 2002; 44: 148–151.

doc. RNDr. Miroslav Pecka, CSc.
www.fnhk.cz
e-mail: pecka@fnhk.cz

Doručeno do redakce: 9. 2. 2009