

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof J. Filipiak  
Redaktor Naczelny „Kardiologii Polskiej”

### Szanowny Panie Redaktorze,

Z dużym zainteresowaniem przeczytałam artykuł doktora Zalewskiego i wsp. [1] poświęcony roli aktywacji płytek krwi w procesie uszkodzenia mikronaczyń u tzw. „ostrych chorych”, z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST.

Autorzy zaobserwowali, że u chorych z defektem perfuzji w spoczynku, względna liczba (%) agregatów płytkowych z monocytami (PMA) i agregatów płytkowych z neutrofilami (PNA) jest znacząco większa przy przyjęciu pacjenta niż w 4. dobie po zabiegu przeszłokrwężnej rewaskularyzacji (PCI). Ponadto Autorzy pokazali, że odsetek zagregowanych płytek, aktywowanych typowym agonistą płytkowym — adenylo-difosforanem (ADP) w stężeniu  $5 \mu\text{M}$ , oznaczony za pomocą agregometru optycznego, istotnie korelował z wielkością obszaru obturacji mikrokrążenia (MVO) badanego przy użyciu techniki obrazowania w rezonansie magnetycznym.

Po przeczytaniu tej pracy klinicznej, o niewątpliwiej wartości poznawczej, nasuwa się wiele przemyśleń, szczególnie dotyczących metod laboratoryjnych wykorzystywanych w badaniu. Badanie funkcji płytek stało się częścią praktyki laboratoryjnej już od wczesnych lat XX wieku. Szczególnie techniki pomiaru agregacji płytek, oparte na wykorzystaniu zdolności tzw. agonistów płytkowych do wywoływania aktywacji płytek *in vitro* (w osoczu bogatopłytkowym, po pobraniu krwi i jej odwirowaniu) oraz tworzenia agregatów płytkowych, zostały opracowane i wprowadzone do diagnostyki przez prof. Gustawa Borna w 1962 r. [2]. Mimo że technika badania agregacji płytek oparta na pomiarze rozproszenia światła (metoda agregometrii optycznej) sama w sobie jest banalna, ciągle pozostaje metodą referencyjną w ocenie ilościowej i jakościowej stopnia pobudzenia płytek. Ocena tworzenia agregatów płytkowych z monocytami i neutrofilami wymaga bardziej zaawansowanych technik diagnostycznych, cytometria przepływowa jest zatem od lat najlepszym narzędziem do badania oddziaływań między płytkami a pozostałymi składnikami morfotycznymi krwi [3].

Zalewski i wsp. [1] do odróżnienia leukocytów niosących płytki od pozostałych leukocytów niezagregowanych z płytkami użyli przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi powierzchniowemu CD61, sprzężonych ze znacznikiem fluorescencyjnym. Z biologicznego punktu widzenia antygen CD61 jest specyficzną glikoproteiną powierzchniową, znaną także jako GP IIIa lub po prostu podjednostką  $\beta 3$  integryny, która tworzy razem z podjednostką  $\alpha$  kompleks integryny, np. z glikoproteiną CD41 tworzy kompleks GP IIb/IIIa. Kompleks ten jest funkcjonalnym receptorem dla fibrynogenu, czynnika von Willebranda i białek macierzy międzykomórkowej, takich jak fibronektyny czy vitronektyny, na aktywowanych płytkach [4]. Ostatnie badania

pokazały jednak, że antygen CD61 jest równocześnie ekspozycjonowany na wszystkich płytkach [5]. Ponadto integryna  $\beta 3$  jest powszechnie ekspozycjonowana na komórkach śródbłonna [6], zatem komórki CD61 pozytywne nie koniecznie powinny być uważane za zwykłe agregaty płytkowo-komórkowe.

Już wcześniej udowodniono, że podczas ostrego zawału serca względna liczba mikrocząstek (MP) uwalnianych z komórek śródbłonna i CD51/61 pozytywnych jest znacząco podwyższona w porównaniu z liczbą MP u osób zdrowych, a nawet u chorych ze stabilną dławicą piersiową [7]. MP są to pęcherzyki komórkowe o submikronowej średnicy, uwalnianie z aktywowanych płytek, a także z komórek stymulowanych lub ulegających apoptozie. MP charakteryzują się zdolnością do adhezji lub tworzą agregaty, nawet z komórkami innego pochodzenia i w odmiennej lokalizacji, dzięki temu że są przenoszone z krwią nawet w odległe miejsca. Ich rola nie sprowadza się tylko do przenoszenia powierzchniowych glikoprotein, ale także uczestniczą w przekaźnictwie międzykomórkowym, transportując fragmenty kwasów nukleinowych [8]. Jest zatem jeszcze wiele niewyjaśnionych mechanizmów, w których mogą uczestniczyć aktywowane płytki lub też inne pochodne komórkowe zbliżone wielkością i budową do aktywowanych płytek krwi [8].

Podsumowując, antygen powierzchniowy CD61 nie jest idealnym markerem do różnicowania aktywowanych płytek. Należy o tym pamiętać, szczególnie gdy nie do końca świadomie korzysta się z zaawansowanych metod laboratoryjnych.

Ewa Stępień

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej,  
Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków

### Piśmiennictwo

- Zalewski J, Durak M, Lech P et al. Platelet activation and microvascular injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Kardiol Pol*, 2012; 70: 677–684.
- Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiology*, 1962; 162: P67–P68.
- Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*, 1996; 87: 4925–4936.
- Ott I, Neumann FJ, Gawaz M et al. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*, 1996; 94: 1239–1246.
- van Velzen JF, Laros-van Gorkom BA, Pop GA et al. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thromb Res*, 2012; 130: 92–98.
- Meckersheimer G, Barth T, Hartschuh W et al. In situ expression of beta 1, beta 3 and beta 4 integrin subunits in non-neoplastic endothelium and vascular tumours. *Virchows Arch*, 1994; 425: 375–384.
- Stępień E, Stankiewicz E, Zalewski J et al. Number of microparticles generated during acute myocardial infarction and stable angina correlates with platelet activation. *Arch Med Res*, 2012; 43: 31–35.
- Stępień E, Kablak-Ziembicka A, Czyż J et al. Microparticles, not only markers but also a therapeutic target in the early stage of diabetic retinopathy and vascular aging. *Expert Opin Ther Targets*, 2012; 16: 677–688.

# Odpowiedź

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof J. Filipiak  
Redaktor Naczelny „Kardiologii Polskiej”

## *Szanowny Panie Redaktorze,*

Dziękujemy Pani dr n. biol. Ewie Stępień za zainteresowanie naszą pracą [1], której zasadniczym celem było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy stopień zahamowania płytek krwi w ostrej fazie zawału przebiegającego z uniesieniem odcinka ST wpływa na wielkość obszaru uszkodzenia mikrokążenia. Obecnie kliniczne znaczenie wysokiej aktywności płytek krwi w trakcie terapii kłopidogrelem jest przedmiotem żywej i wciąż otwartej debaty [2]. Dotychczas nie próbowano oceniać wpływu skuteczności leczenia przeciwplatekowego na wielkość uszkodzenia reperfuzyjnego.

W naszym badaniu do oszacowania szkody spowodowanej niedokrwieniem i następującą falą reperfuzji wykorzystaliśmy techniki rezonansu magnetycznego umożliwiające ilościowy pomiar masy mięśnia objętego zawałem i uszkodzonym mikrokążeniem [3]. Z kolei funkcję płytek krwi zbadaliśmy za pomocą agregometrii optycznej, oznaczając ich reaktywność po stymulacji kwasem arachidonowym i dwufosforanem adenozyliny. Ponadto, używając cytometrii przepływowej, zmierzaliśmy stężenie agregatów płytkowo-leukocytarnych, adaptując wcześniej już opisaną metodykę [4]. W technice tej najpierw za pomocą fluorescencyjnie wyznakowanych przeciwciał wyodrębnia się całą populację leukocytów, a następnie, inkubując tak zdefiniowane komórki ze znakowanym fluorescencyjnie przeciwciałem anti-CD61,

określa się liczbę leukocytów zagregowanych z płytkami krwi i wyraża jako odsetek całej populacji leukocytów. Równoległa kontrola negatywna z izotypowymi przeciwciałami pozwala wyodrębnić populację płytek krwi niezwiązanych z leukocytami [1, 4].

Reasumując, nie można przedstawionego w naszej pracy oznaczenia agregatów leukocytarno-płytkowych sprowadzić jedynie do oznaczenia populacji komórek CD61 pozytywnych. Ponad wszelką wątpliwość nie uważamy, że izolowane oznaczenie glikoproteiny CD61 można uznać za marker aktywacji płytek krwi.

*Autorzy pracy*

## *Piśmiennictwo*

1. Zalewski J, Durak M, Lech P et al. Platelet activation and microvascular injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Kardiol Pol*, 2012; 70: 677–684.
2. Holmes MV, Perel P, Shah T et al. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events. A systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2011; 306: 2704–2714.
3. Zalewski J. Cardiac magnetic resonance imaging of acute myocardial infarction. *Kardiol Pol*, 2010; 68 (suppl. 5): 441–447.
4. Michelson AD, Barnard MR, Lori A et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*, 2001; 104: 1533–1537.