

Praca oryginalna • Original Article

Wpływ agonistów, trombiny lub ADP na generację mikroplatełek u noworodków urodzonych przedwcześnie

Alicja Wasiluk¹, Maria Mantur², Halina Kemon², Marek Szczepański¹, Janusz Warda¹

¹Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka, ²Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Praca finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr 4-05-884P.

Streszczenie

Cel: Celem pracy była ocena aktywacji płytek krwi pępowinowej u 51 noworodków urodzonych przedwcześnie (poniżej 37. tygodnia ciąży) poprzez pomiar odsetka mikroplatełek oraz ocena reaktywności płytek – po zastosowaniu agonistów: trombiny lub ADP. Istniejące u tych noworodków zagrożenia związane z ich niedojrzałością, np. zaburzenia hemostazy, odporności mogą być w pewnym stopniu wyjaśnione poprzez ocenę aktywacji i reaktywności płytek krwi. **Metody:** Mikroplatełki oznaczano metodą cytometrii przepływowej. Krew do badań pobierano bezpośrednio po porodzie łóżyska, ze środkowego odcinka podwójnie zakleszczonej pępowiny, z tętnicy pępowinowej, do probówek z CTAD. **Wyniki:** Płytki krwi wcześniaków w warunkach *in vivo* uwalniały 4,12% mikroplatełek u płci żeńskiej, 4,08% u płci męskiej. Po zastosowaniu silnego agonisty – trombiny – nastąpił wzrost odsetka mikroplatełek średnio do 5,7% u wcześniaków płci żeńskiej, podobnie u płci męskiej do 6,46%. Po pobudzeniu płytek przez słabszego agonistę – ADP wzrost odsetka mikroplatełek był słabszy niż po trombinie: u wcześniaków płci żeńskiej wzrósł do 5,18%, a u płci męskiej do 5,01%.

Wnioski: Brak różnic istotnych statystycznie w uwalnianiu mikroplatełek, zależnie od płci, zarówno w warunkach *in vivo* przed stymulacją płytek krwi, jak i po ich pobudzeniu przez trombinę lub ADP w warunkach *in vitro* prawdopodobnie wynika z hipofunkcji płytek krwi u noworodków urodzonych przedwcześnie.

The effect of agonists, trombin or ADP on the generation microplatelets in preterm newborns

Summary

Aim: The aim of this investigations was the evaluation of activation of umbilical blood platelets in the group of 51 neonates born prior to the 37th gestational week. The evaluation was carried out by the measurement of platelet reactivity assessment after agonists such as thrombin or ADP were applied. The risk connected with immaturity of newborns, for instance hemostasis or immunological disorders can be explained to some extent by the platelet activation and evaluation of the reactivity. **Methods:** Microplatelets were determined using flow cytometry. Blood was sampled with umbilical artery to the tubes with CTAD. **Results:** Neonatal thrombocytes in *in vivo* conditions released microplatelets (female 4,12%; male 4,8%). Having used a strong agonist – thrombin the average increase of platelets' percentage was 5,7% for female neonates, similarly for male neonates 6,46%. Platelets having been stimulated by a weaker agonist –ADP the increase of microplatelets percentage was smaller than after thrombin: female neonates 5,18%, male neonates 5,01%.

Conclusions: No statistical significant differences in creation of microplatelets as *in vivo* conditions as well after stimulation by thrombin or ADP may results with hypofunction of platelets in preterm newborns.

Słowa kluczowe: noworodki urodzone przedwcześnie, trombina, ADP, mikroplatełki

Key words: preterm newborns, thrombin, ADP, microplatelets

Wstęp

Mikroplatełki są to bardzo drobne fragmenty płytek krwi odłączane w czasie uwypuklenia błony plazmatycznej podczas aktywacji lub apoptozy płytek [16]. Mają wielkość od 100 nm do 1 µm, zawierają części błony plazmatycznej, bogatej w fosfolipidy (m.in. fosfatydyloserynę), dzięki czemu wykazują aktywność prokoagulacyjną. Na ich powierzchni nie-

aktywne czynniki krzepnięcia stają się aktywne Xa, Va), zachodzi generacja trombiny [13]. Mikroplatełki nazywane są w związku z tym prokoagulantem drobnofragmentarycznym PM (*procoagulant microparticles*). Mikroplatełki są określane za pomocą dwóch kryteriów: wielkości i ekspresji fosfatydyloseryny [5, 6, 11, 14]. Ponieważ mikroplatełki powstają w stanach, w których do-

chodzi do aktywacji płytek, ich liczba świadczy o zdolności płytek do aktywacji i uznawana jest za ważny wskaźnik ich aktywacji, np. w stanach niedotlenienia/niedokrwienia, w uszkodzeniu naczyń, w procesach zapalnych. Do oceny reaktywności płytek, czyli ich maksymalnej zdolności do aktywacji, konieczna jest ocena mikroplatek po zastosowaniu agonistów trombiny lub ADP.

Noworodki urodzone przedwcześnie wykazują różnego stopnia trudności adaptacyjne do życia pozamacicznego m.in. w zakresie hemostazy.

Celem pracy jest ocena reaktywności płytek w warunkach *in vitro*, po zastosowaniu na płytce dwóch agonistów: trombiny lub ADP oraz czy generacja mikroplatek ma związek z płcią badanych noworodków.

Materiał i metody

Badano 51 noworodków urodzonych przedwcześnie: 25 noworodków płci żeńskiej i 26 noworodków płci męskiej. Dzieci były urodzone w różnym wieku płodowym: od 25 do 36 tygodni ciąży, drogami i siłami natury lub drogą cięcia cesarskiego, w różnym stanie ogólnym, ocenianym według skali Apgar w 1., 3. i w 5. minucie życia, z różną masą urodzeniową, zawartą pomiędzy 860 a 2 960 gramów. Wiek płodowy podawano w ukończonych tygodniach ciąży. Do badań zakwalifikowano noworodki urodzone poniżej 37. tygodnia ciąży. Z badań wykluczono noworodki z potwierdzoną klinicznie i laboratoryjnie infekcją wewnątrzmaciczną. Matki zakwalifikowanych do badań noworodków nie otrzymywały leków wpływających na układ hemostazy w ciągu ostatnich 10 dni przed porodem. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku Nr R-I-002/168/2008. Badania przeprowadzono u noworodków urodzonych w Klinice Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oznaczenia wykonywano w Zakładzie Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

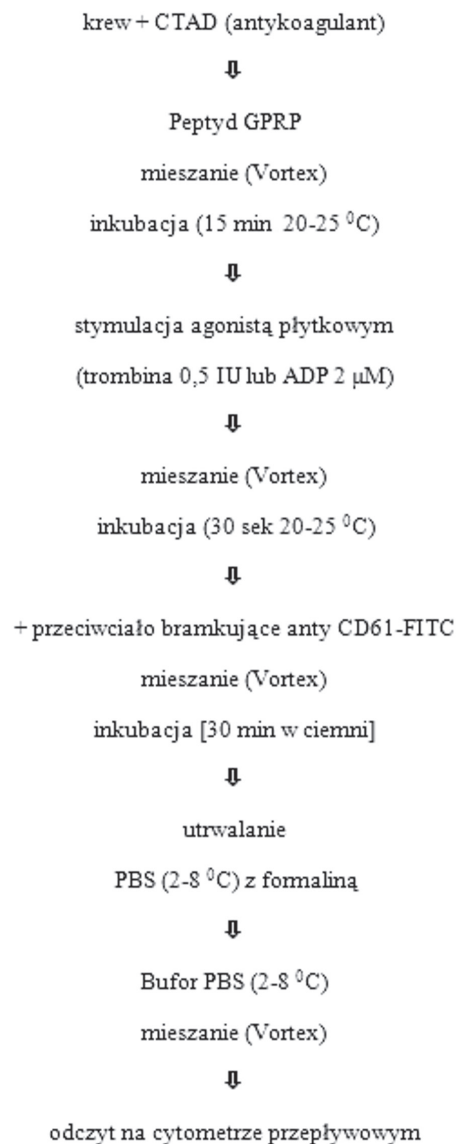
Wiek płodowy wcześniaków płci żeńskiej wahał się pomiędzy 27. a 36. tygodniem ciąży (średnio $33,2 \pm 2,81$ tygodnia ciąży), a wcześniaków płci męskiej pomiędzy 25. a 36. tygodniem ciąży (średnio $32,7 \pm 3,21$ tygodnia ciąży).

Krew do badań pobierano bezpośrednio po porodzie łożyska, ze środkowego odcinka podwójnie zakleszczonej pępowiny, z tętnicy pępowinowej, do probówek z CTAD (cytrynian, teofilina, adenozyne, dipirydamol) w celu oznaczania mikroplatek. W celu uniknięcia aktywacji płytek pierwszy 1 ml krwi odrzucano. Materiał był transportowany do pracowni w ciągu 10 minut od pobrania.

Badanie mikroplatek krwi metodą cytometrii przepływowej wykonano na cytometrze przepływowym EPICS XL firmy Coulter Electronics Corporation, FL, USA. W celu identyfikacji mikroplatek zastosowano bramkujące przeciwciało monoklonalne anty-CD61, które wiąże się z wolną cząsteczką adhezyjną GPIIIa (CD61) lub związaną w kompleksie GPIIb/IIIa (CD41/CD61) na powierzchni płytek krwi oraz na błonie płytkowej wszystkich struktur płytkopochodnych. Podczas

oznaczania przeciwciało monoklonalne znakowane fluorochromem (w tym przypadku FITC = izotiocjanian fluoresceiny) łączy się ze swoistym receptorem na płytce krwi. Intensywność fluorescencji odczytuje się na cytometrze przepływowym przy odpowiedniej długości fali w zależności od stosowanego fluorochromu.

Oznaczano subpopulację mikroplatek przed i po zastosowaniu agonistów: trombiny (stężenie końcowe w badanym układzie 0.5 IU) lub ADP (stężenie końcowe w badanym układzie $2 \mu\text{M}$). Liczba mikroplatek została oceniona jako odsetek całkowitej liczby płytek krwi. Za każdym razem analizie poddawano 10^4 elementów morfotycznych. Do każdego badania wykonywano próbę kontrolną, znakując płytki krwi anty CD-61-FITC i nieswoistym przeciwciałem kontrolnym. Procedurę badania reaktywności płytek krwi za pomocą oznaczania odsetka mikroplatek po zastosowaniu agonistów: trombiny lub ADP metodą cytometrii przepływowej prowadzono według algorytmu [2, 3] (ryc. 1).



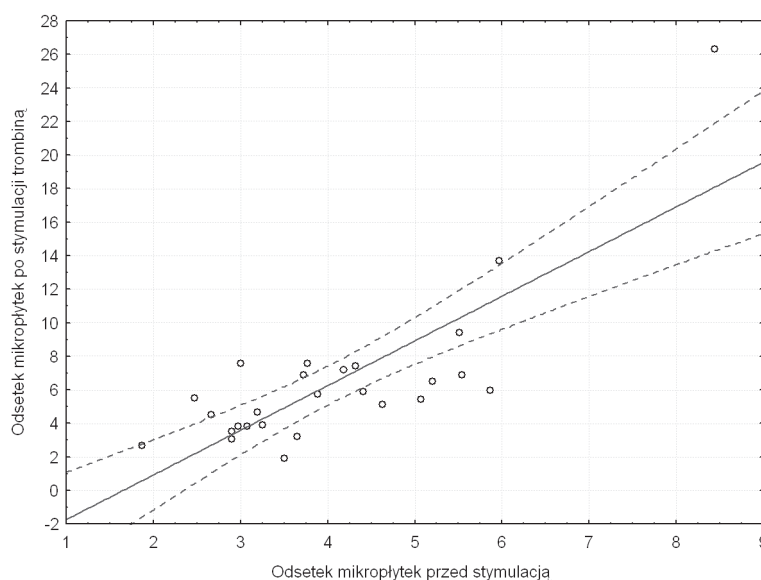
Rycina 1
Procedura badania reaktywności płytek krwi za pomocą oznaczania odsetka mikroplatek po zastosowaniu agonistów: trombiny lub ADP metodą cytometrii przepływowej.

Analiza statystyczna: analizując cechy ilościowe, nie stwierdzono istnienia normalności rozkładu, dlatego do ich dalszej analizy wykorzystano testy nieparametryczne. Poszukując różnic pomiędzy dwiema próbami niezależnymi, wykorzystano test U Manna-Whitneya. Przy porównywaniu prób zależnych użyto testu kolejności par Wilcoxon. Charakterystykę poszczególnych grup przedstawiono przy pomocy średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego. Wyznaczono także współczynnik korelacji porządku rang Spearmana. W analizie statystycznej wykorzystano pakiet Statistica 7.1 firmy StatSoft. Różnice istotne statystycznie uznano na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Wcześnieiki płci żeńskiej wykazują zbliżony procent mikrocytek 4,12 do noworodków płci męskiej 4,08 w warunkach *in vivo*. Dodanie trombiny do badanego układu zwiększa

procent mikrocytek u noworodków płci żeńskiej do 5,70, a w grupie męskiej do 6,46. ADP jako słaby agonista powoduje mniejszy przyrost mikrocytek, podobny w obu grupach, w grupie żeńskiej 5,18 %, a męskiej 5,01% (tab. I). Po pobudzeniu płytek wcześniaków za pomocą trombiny lub ADP nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w zależności od płci. Analiza korelacji wykazała w grupie wcześniaków płci męskiej istnienie wysokich, dodatnich korelacji pomiędzy odsetkiem mikrocytek przed stymulacją a odsetkiem mikrocytek po stymulacji trombiną ($R=0,68$, $p < 0,001$) (ryc. 2), pomiędzy odsetkiem mikrocytek przed stymulacją a odsetkiem mikrocytek po stymulacji ADP ($R=0,5$, $p < 0,01$) (ryc. 3), pomiędzy odsetkiem mikrocytek po stymulacji trombiną a odsetkiem mikrocytek po stymulacji ADP ($R=0,64$, $p < 0,001$) (ryc. 4). W grupie wcześniaków płci żeńskiej stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem mikrocytek przed stymulacją i po stymulacji ADP ($R=0,4$, $p=0,048$) (ryc. 5).



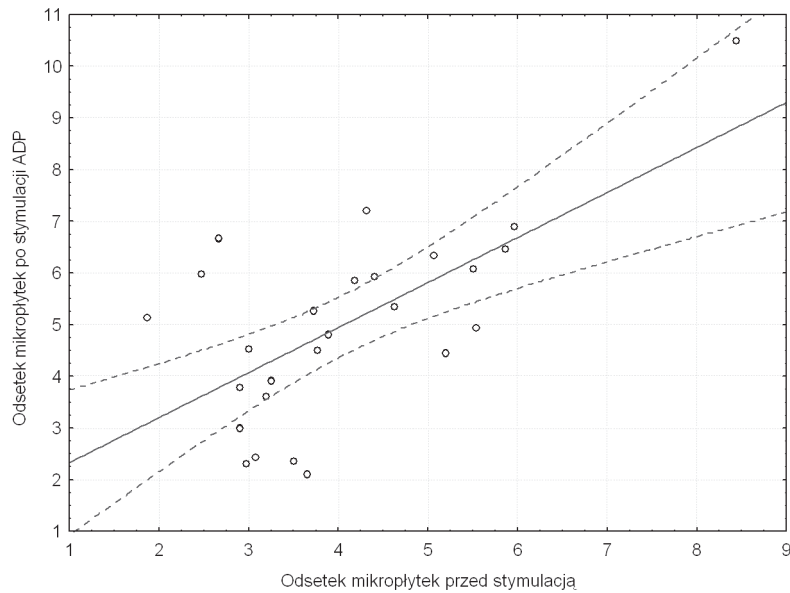
Rycina 2

Korelacje pomiędzy odsetkiem mikrocytek przed stymulacją a odsetkiem mikrocytek po stymulacji trombiną w grupie wcześniaków płci męskiej ($R=0,68$, $p < 0,001$).

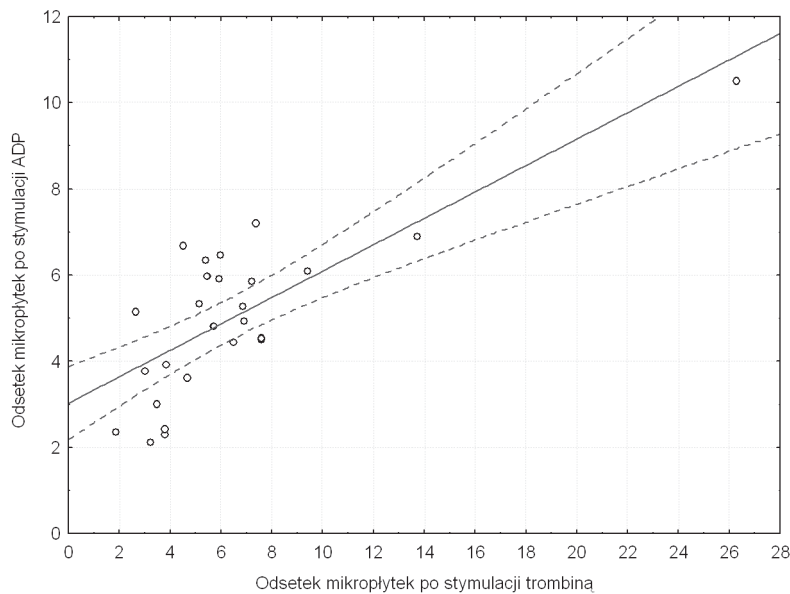
Tabela I

Odsetek mikrocytek u wcześniaków płci żeńskiej i męskiej przed stymulacją oraz po stymulacji trombiną, 0.5 IU lub ADP, 2 μ M .

	Liczba noworodków n = 51	Mikrocytki (%)	
		Średnia x	\pm SD
Przed stymulacją	płci żeńskiej n = 25	4,12	1,487
	płci męskiej n = 26	4,08	1,422
Po stymulacji trombiną, 0.5 IU	płci żeńskiej n = 25	5,70	2,557
	płci męskiej n = 26	6,46	4,725
Po stymulacji ADP, 2 μ M	płci żeńskiej n = 25	5,18	1,981
	płci męskiej n = 26	5,01	1,876



Rycina 3
Korelacje pomiędzy odsetkiem mikroplatek przed stymulacją a odsetkiem mikroplatek po stymulacji ADP w grupie wcześniaków płci męskiej ($R=0,5$, $p=0,01$).

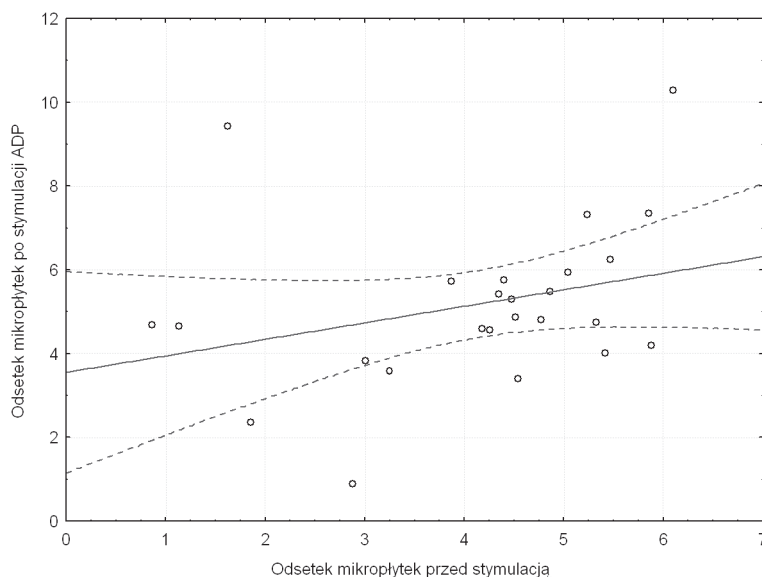


Rycina 4
Korelacje pomiędzy odsetkiem mikroplatek po stymulacji trombiną a odsetkiem mikroplatek po stymulacji ADP w grupie wcześniaków płci męskiej ($R=0,64$, $p<0,001$).

Dyskusja

Agoniści płytek krwi są zdolni do wywołania ich pobudzenia, silni agoniści mogą wywołać maksymalną, pełną aktywację płytek. Do najczęściej stosowanych należą: trombina, ADP [4, 17]. ADP jest słabym agonistą, działa głównie poprzez pobudzenie receptorów P2Y1 znajdujących się na powierzchni płytki, których liczbę ocenia się na około 150 [60]. P2Y1 jest najważniejszym receptorem płytkowym dla ADP, tworzy on ATP-zależny kanał wapniowy i jest odpowiedzialny za 90% napływu jonów Ca do wnętrza płytki [10]. Trombina jest białkiem o właściwościach enzymatycznych. Ta proteaza serynowa działa na inne receptory powierzch-

niowe płytek niż ADP. Receptory dla trombiny to: PAR-1 i PAR-4 związane z białkami. Aktywacja PAR-1 lub PAR-4 zapoczątkowuje agregację i sekrecję płytek krwi [9]. Receptorem dla trombiny jest również GPIIb [7]. Interakcja GPIIb z czynnikiem vWF umożliwia adhezję płytek krwi do uszkodzonej ściany naczyń krwionośnych, powoduje agregację płytek. Zastosowanie trombiny i ADP pozwala ocenić jaka jest możliwa maksymalna aktywacja płytek, czyli ich reaktywność u noworodków urodzonych przedwcześnie. W ten sposób można pośrednio ocenić rolę płytek krwi w utrzymaniu hemostazy u tych noworodków. Liczne badania wskazują na to, że u noworodków płytki krwi



Rycina 5
Korelacje pomiędzy odsetkiem mikrocytów przed stymulacją a odsetkiem mikrocytów po stymulacji ADP w grupie wcześniaków płci żeńskiej ($R=0,4$, $p=0,048$).

są niedojrzałe czynnościowo, zwłaszcza hyporeaktywne w procesach hemostazy i fagocytozy. Wykazują mniejszą reaktywność w odpowiedzi na trombinę, ADP, tromboksan A2 w porównaniu do osób dorosłych [12, 15]. Wykazują również mniejszą zdolność do ekspresji receptorów GPIa/IIa, GPIb, GPIIb/IIIa [19], oraz P-selektyny po zastosowaniu trombiny/ADP [18]. U noworodków, zwłaszcza urodzonych przedwcześnie, istnieje chwiejna równowaga pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy. Ze względu na budowę i wielkość mikrocytów pomiar ich jako wskaźnika aktywacji i reaktywności płytek może mieć większą wartość niż pomiar innych wskaźników aktywacji płytek krwi, np. PF4, β -TG. Mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego wykazują olbrzymie działanie plejotropowe, mają największy zakres działania spośród innych parametrów oceniających funkcje płytek krwi. Współdziałają z neutrofilami i komórkami śródbłonna, uczestnicząc w reakcjach zapalnych [1, 8]. Mogą dotrzeć do miejsc niedostępnych dla płytek krwi, a ich powierzchnia bogata jest w czynniki aktywujące krzepnięcie i oddziaływujące na śródbłonek naczyń krwionośnych. Dostępność składników układu krzepnięcia i ekspresja receptorów na powierzchni mikrocytów stwarza wyjątkowo korzystną sytuację do ich udziału w procesach hemostazy. Wzrost liczby mikrocytów daje gwarancję większych możliwości korekty hemostazy. Ze względu na funkcje mikrocytów wzrost ich odsetka może mieć korzystny wpływ nie tylko na układ hemostazy, ale i na homeostazę organizmu noworodków urodzonych przedwcześnie. Nie mamy możliwości porównania badań własnych z wynikami badań innych autorów. Jest to pierwsza w piśmiennictwie praca oceniająca reaktywność płytek krwi wcześniaków za pomocą oceny odsetka mikrocytów. Pozwala to na rzeczywistą ocenę funkcji płytek krwi w tej grupie noworodków, gdzie istnieją realne zagrożenia

dysfunkcji układu hemostazy. Stwierdziliśmy, że stopień zagrożenia w równym stopniu dotyczy noworodków obu płci. Wykazane korelacje wskazujące na zależność wzrostu mikrocytów od zastosowanych agonistów, trombiny lub ADP i wskazują, że płytki noworodków urodzonych przedwcześnie są wrażliwe na stosowane bodźce i w stanach zagrożenia są zdolne do zwiększenia swego potencjału hemostatycznego.

Wnioski

Brak różnic istotnych statystycznie w generacji mikrocytów, zależnych od płci zarówno w warunkach *in vivo* przed stymulacją płytek krwi, jak i po ich pobudzeniu przez trombinę lub ADP w warunkach *in vitro*, prawdopodobnie wynika z hipofunkcji płytek krwi u noworodków urodzonych przedwcześnie.

Piśmiennictwo

1. Andrews RK, Berndt MC. Microparticles facilitate neutrophil/platelet crosstalk. *Blood* 2008; 112: 2174-2175.
2. Baj Z. Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach płytek krwi. *Centr Europ J Immunol* 1996; 21: 119-127.
3. Becton Dickinson Procedures. Flow cytometry analysis of platelets. *Source Book Section* 1991; 8: 19-35.
4. Berndt MC, Andrews RK. Systems biology meets platelet biology. *Blood* 2008; 112: 3920-3921.
5. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48:180-186.
6. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC i wsp. Microparticles as regulators of inflammation. Novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3337-3348.
7. Dörmann D, Clementson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* 2000; 96: 2469-2478.
8. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 2004; 104: 2543-2548.

9. Kah M, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ. Protease activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *Clin Invest* 1999; 103:879-887.
10. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S i wsp. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2317-2326.
11. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol* 2005; 288: 1004-1009.
12. Michelson AD. Platelet function in the newborn. *Semin Thromb Haemost* 1998; 24: 507-512.
13. Michelson AD, Rajasekhar D, Bednarek FJ i wsp. Platelet and platelet-derived microparticle surface factor V/Va binding in whole blood: differences between neonates and adults. *Thromb Haemost* 2000; 84: 689-694.
14. Morel O, Toti F, Hugel B i wsp. Procoagulant microparticles. Disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2594-2604.
15. Pietrucha T, Wojciechowski T, Greger J i wsp. Differentiated reactivity of whole blood neonatal platelets to various agonists. *Platelets* 2001; 12: 99-107.
16. Pluskota E, Woody NM, Szpak D i wsp. Expression, activation, and function of integrin $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008; 112: 2327-2335.
17. Purvis JE, Chatterjee MS, Brass LF i wsp. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation. *Blood* 2008; 112: 4069-4079.
18. Wasiluk A. Markers of platelets activation, CD62P and soluble P-selectin in healthy term neonates. *J Perinat Med* 2004; 32: 514-515.
19. Wasiluk A. Membrane-activated form of glycoproteins IIb/IIIa complex on newborn platelets. *Fetal Diagn Ther* 2006; 21: 177-180.

Adres Autorów:

Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
ul. Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok
tel.: (+48 85) 746 84 98
faks: (+48 85) 746 86 63
e-mail: awasiluk@umwb.edu.pl

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2009-07-03)

(Praca przekazana do opublikowania: 2009-06-06)