

ÚSKALÍ MĚŘENÍ TROMBOXANŮ V KLINICKÉ PRAXI

TOMÁŠ ADÁMEK^a, ZOLTÁN PALUCH^b
a ŠTEFAN ALUŠÍK^c

^a Interní oddělení, Thomayerova nemocnice, Vídeňská 800, 140 59 Praha 4 - Krč, ^b Ústav farmakologie 2. LF UK Praha, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, ^c Katedra vnitřního lékařství IPVZ, Ruská 85, 100 05 Praha 10
stefan.alusik@seznam.cz

Došlo 4.9.18, přijato 18.2.19.

Klíčová slova: aspirin, cyklooxygenasa, tromboxan B₂, 11-dehydrotromboxan B₂

Obsah

1. Úvod
2. Rozpor mezi měřeními a skutečnými hodnotami tromboxanů
3. Zlatý standard měření účinku aspirinu
4. Nedostatečná suprese tromboxanů a zvýšené kardiovaskulární riziko
5. Mimodestičkový tromboxan
6. Přímé metody průkazu acetylace cyklooxygenasy-1 a cyklooxygenasy-2
7. Závěr

1. Úvod

Aspirin (kyselina acetylsalicylová) se v léčbě používá téměř 120 let¹, ale mechanismus účinku byl objeven mnohem později, až po 80 letech jeho používání v léčbě². Kyselina acetylsalicylová patří do široké skupiny nesteroidních antirevmatik. Dnes se nejčastěji používá jako antiagregans v prevenci kardiovaskulárních příhod. Antiagregační účinek aspirinu se vysvětluje trvalou inaktivací kritického proteinu krevních destiček – prostaglandin G/H synthasy 1 (běžně nazývané cyklooxygenasa-1, COX1). K inaktivaci COX1 dochází v důsledku acetylace hydroxylové skupiny serinového residua v místě Ser529 u lidí, v experimentu u ovcí Ser530 (cit.³). Nízké dávky aspirinu mají za následek dlouhodobou supresi produkce tromboxanu A₂ (TXA₂) a jím zprostředkované aktivace a agregace destiček. TXA₂ je důležitý prostaglandinový metabolit, který vzniká z arachidonové kyseliny (uvolněné z membránových fosfolipidů destiček) za působení COX1. TXA₂ je velmi nestabilní (biologický poločas 20 až 30 s)

a jeho měření v praxi je obtížné. Je rychle hydrolyzován na biologicky inaktivní formu, tromboxan B₂ (TXB₂), který je mnohem stabilnější. TXB₂ se dále metabolizuje v játrech na stabilní 11-dehydrotromboxan B₂ (11-dehydro--TXB₂) a 2,3-dinor-tromboxanu B₂ (2,3-dinor-TXB₂). Oba jsou vylučovány močí (obr. 1).

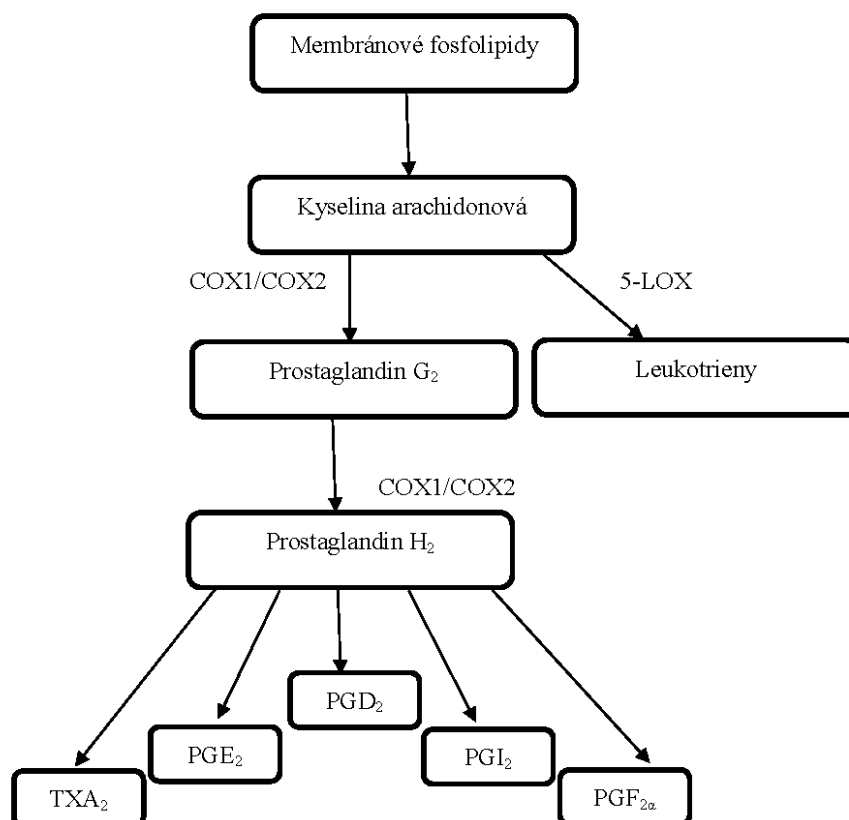
Používané laboratorní metody stanovení tromboxanů můžeme rozdělit do tří skupin:

- bioeseje,
- radioimunoeseje,
- chromatografické metody spojené s hmotnostní spektrometrií.

V klinické praxi se nejvíce rozšířily metody enzymové imunoanalýzy (EIA), které jsou poměrně jednoduché a umožňují vyšetření i velkých souborů vzorků. Tromboxany se nejčastěji vyšetřují v krevním séru nebo plazmě a v moči, ale mohou se vyšetřovat i v ostatních tělesných tekutinách.

2. Rozpor mezi měřeními a skutečnými hodnotami tromboxanů

Krevní destičky jsou vysoce reaktivní a v momentě, kdy se ocitnou *ex vivo*, se rychle aktivují a rapidně zvýší produkci TXA₂, která daleko převyšuje aktuální produkci v organismu. Období odběru vzorku a jeho následné zpracování je klíčové pro výsledné hodnoty měřených tromboxanů. Uvádí se, že aktivace už 0,1 % trombocytů vede ke zvýšení TXB₂ v plazmě na 200–400 μg m⁻³, přičemž bazální koncentrace TXB₂ se pohybuje pod 2 μg m⁻³ (cit.⁴). Proto měření koncentrací TXB₂ v plazmě jako index tvorby tromboxanu v cirkulaci pokládají někteří autoři za nevhodné⁵. TXB₂ se dále metabolizuje hlavně v játrech. Pozornost výzkumníků se proto soustředila na měření dalších metabolitů, a to 2,3-dinor-TXB₂ a 11-dehydro-TXB₂. Předpokládalo se, že se tím vyřeší problém s *ex vivo* aktivací destiček. Oba metabolity je možné stanovit v plazmě i v moči. V klinické praxi se rozšířilo zejména měření 11-dehydro-TXB₂ v moči, méně v plazmě a v séru. Molekula 11-dehydro-TXB₂ je velmi stabilní, má relativně dlouhý biologický poločas (45 min) a močí se vylučuje ve větším množství než ostatní metabolity. Jeho monitorování se pokládá za metodu volby pro sledování rovnovážného stavu tromboxanu *in vivo*, s koncentracemi v plazmě kolem 1–2 μg m⁻³ (cit.⁶). Ani tento parametr však není specifický pro tromboxan produkovaný trombocyty. Uvádí se, že až 30 % 11-dehydro-TXB₂ v moči pochází z mimodestičkových zdrojů (monocyty/makrofágy, endoteliální buňky cév atd.). Tato mimodestičková produkce 11-dehydro-TXB₂ se zvyšuje s intenzitou zánětu⁷. Na dru-



Obr. 1. Schématické znázornění vzniku jednotlivých prostaglandinů z membránových fosfolipidů; COX-1 – cyklooxygenasa-1, COX-2 – cyklooxygenasa-2, 5-LOX – 5-lipoxygenasa, TXA₂ – tromboxan A₂, PGE₂ – prostaglandin E₂, PGD₂ – prostaglandin D₂, PGI₂ – prostaglandin I₂ (prostacyklin), PGF_{2α} – prostaglandin F₂

hé straně za výhody této metody je možno označit fakt, že k vyšetření postačuje i malé množství vzorku moče (1 cm⁻³) namísto obvyklých 8–10 cm⁻³. Kromě toho dobrá stabilita 11-dehydro-TXB₂ byla potvrzena i ve vzorcích skladovaných při teplotě 25 °C po dobu 6 dní (cit.⁸).

3. Zlatý standard měření účinku aspirinu

Pro laboratorní hodnocení antiagregačního účinku aspirinu se za zlatý standard pokládá vyšetření sérových koncentrací TXB₂ a také Evropská léková agentura (European Medicine Agency, EMA) pokládá sérové koncentrace TXB₂ za jediný validní marker pro hodnocení účinku různých přípravků s obsahem aspirinu⁹. Vyšetření sérových koncentrací TXB₂ probíhá ve vzorku celé krve bez použití antikoagulancií a po hodinové inkubaci vzorku při teplotě 37 °C. Nevýhodou stanovení tohoto markeru je značná variabilita výsledků, která je způsobena zejména nejednotnými postupy při zpracování vzorku. Naměřené hodnoty v klinických studiích se často liší až desetinásobně (cit.^{10,11}). Při doporučeném postupu s inkubací vzorku

jsou již dobře měřitelné i sérové koncentrace jeho stabilnějšího metabolitu 11-dehydro-TXB₂. Ten se nejčastěji vyšetřuje v moči¹². I toto vyšetření je zatíženo značnou chybou, jak jsme uvedli výše. Sérové koncentrace 11-dehydro-TXB₂ jsou dobře měřitelné u inkubovaných vzorků pacientů bez léčby. Po podání malých dávek aspirinu (nejčastěji definovaných jako dávka 81–325 mg den⁻¹) dochází k mohutné supresi tromboxanu (95–99 %) a suprimované hodnoty se mohou dostat pod detekční limit použitého EIA setu. Koncentrace 11-dehydro-TXB₂ v séru, zejména po inkubaci vzorku, jsou mnohem vyšší než v plazmě (tab. I) (cit.^{6,13–22}). Za nejkritičtější dobu při zpracování vzorku pokládají někteří autoři dobu od odběru po zahájení inkubace²³.

4. Nedostatečná suprese tromboxanů a zvýšené kardiiovaskulární riziko

Nedostatečná suprese tromboxanu má za následek častější výskyt kardiiovaskulárních příhod včetně mozkových. Ve studii Eikelbooma a spol.²⁴ bylo prokázáno, že

Tabulka I

Koncentrace 11-dehydrotromboxanu B₂ v krevním séru a plazmě v závislosti na použité vyšetřovací metodě a době inkubace vzorku

Autor	Sérum/ plazma	Metoda stanovení ^a	Doba inkubace [h]	Koncentrace 11-dehydro TXB ₂ [μg m ⁻³]
Catella ⁶	sérum	GC-NICI-MS	1	5000
Reinke ¹³	sérum	EIA	0,5–4	800–1300 (0,5 h) až 24 000–48 000 (4 h)
Takasaki ¹⁴	plazma	EIA	bez	4,0 ± 0,3
Xu ¹⁵	sérum	EIA	neudaná	181 ± 35
Kawano ¹⁶	sérum	RIA	bez	2400 ± 500
Satoh ¹⁷	plazma	RIA	bez	1,8 ± 0,9
Achuthan ¹⁸	plazma	EIA	bez	98–967
Sadílková ¹⁹	plazma	EIA	1	489 ± 13
Sadílková ²⁰	sérum	EIA	1	2300
Katoh ²¹	plazma	RIA	bez	17,3 ± 6
Obase ²²	plazma	RIA	bez	115,8 ± 266

^a GC – plynová chromatografie, NICI – chemická ionizace negativních iontů, MS – hmotnostní spektrometrie, EIA – enzymová imunoanalýza, RIA – radioimunoanalýza

pacienti s hodnotami tromboxanu v horních kvartilech měli 2krát častěji srdeční infarkt a 3,5násobně vyšší úmrtnost v porovnání se skupinou pacientů s nízkými hodnotami 11-dehydro-TXB₂ v moči (dolní kvartily). Od té doby bylo provedeno velké množství klinických studií, které potvrdily zvýšené kardiovaskulární riziko u pacientů s nedostatečně suprimovanými hodnotami tromboxanu.

Příčiny nedostatečné suprese tromboxanu aspirinem jsou různé. Za nejčastější se pokládá non-compliance (nespolupráce, neužívání léků). Laboratorní metodu k ověření užívání aspirinu jsme v tomto časopise popsali již dříve²⁵.

I při ověření compliance (adherence k léčbě) u některých pacientů není dosaženo dostatečné suprese tromboxanu (tj. 95 % a více). Nejčastěji k tomu dochází u pacientů s diabetes mellitus, u obézních nemocných, u pacientů s hyperlipidemií, se zánětem apod. Výsledek mohou ovlivňovat i užívané léky²⁶, obvykle ne však výrazně.

Také počet trombocytů může mít vliv na hodnoty tromboxanů, ale v běžné populaci s počtem trombocytů ve fyziologickém rozmezí (150·10⁹–400·10⁹ dm⁻³) jsou rozdíly nevýznamné. Počet trombocytů může mít význam u některých onemocnění, např. u myeloproliferativních chorob, kde se počet destiček může zvyšovat několikanásobně. V těchto případech se zvyšuje dávka aspirinu i frekvence jeho podávání 2krát denně (zvýšený obrat destiček).

Neúspěšná suprese tromboxanu vedla u některých pacientů k vytvoření koncepce tzv. aspirinové rezistence²⁷. Situaci měla zlepšit a tzv. reziduální tromboxan měla potlačit různá opatření, např. zvýšení dávky aspirinu, jeho podávání 2krát za den místo jedenkrát, nepoužívání aspirinových přípravků s pomalým uvolňováním kyseliny ace-

tylsalicylové (kvůli zhoršenému vstřebávání – zejména u diabetiků) apod. (cit.^{28,29}).

5. Mimodestičkový tromboxan

Podle nejnovějších poznatků se nedostatečná suprese tromboxanu vysvětluje produkcí tzv. mimodestičkového tromboxanu, jak jsme se zmiňovali již dříve. Tento tromboxan vzniká v monocytech/makrofázích a endoteliálních buňkách *via* COX2. K potlačení tvorby tohoto tromboxanu malé dávky aspirinu nestačí. K acetylaci COX2 je potřeba vyšších dávek kyseliny acetylsalicylové – 1200 mg a více. Novější práce ukázaly, že i destičky obsahují malé množství COX2 (cit.³⁰). Přesto u malých dávek aspirinu acetylase COX2 nepřevyšuje 5 %, zatímco u COX1 dosahuje více než 70 % (cit.³¹). Kromě toho, malé dávky aspirinu mohou ovlivňovat produkci tromboxanu i nepřímo. Zlepšují funkci endotelu a tím omezují možnost produkce mimodestičkového tromboxanu³². Také tento tromboxan, který dosahuje 30 % celkové produkce tromboxanu a jehož podíl se u zánětů včetně aterosklerózy zvyšuje, je pro pacienta prognosticky nepříznivý^{33,34}. Jenom připomeneme, že rutinní EIA metody stanovují celkový tromboxan vzniklý cestou COX1 a COX2.

6. Přímé metody průkazu acetylase COX1

Zejména v kardiologickém výzkumu se v posledních letech hojně využívají různé proteomické laboratorní techniky³⁵, včetně metody absolutní kvantifikace (AQUA)

proteinů. Patří mezi nové, tzv. přímé metody, které mají schopnost prokázat přímo acetylovanou a neacetylovanou COX1 (cit.^{35–37}). Mezi přímé metody patří i metoda vypracovaná maďarskými autory, a to stanovení pomocí Western blotu (imunoblotu)³⁸. Tyto přímé metody jsou vysoce sofistikované, náročné na čas i vybavení a nejsou zatím vhodné pro rutinní použití při vyšetření velkého počtu pacientů. Získané výsledky jsou však mnohem přesnější a slouží jako referenční pro jiné metody.

7. Závěr

Nedostatečně suprimované hodnoty tromboxanů představují pro pacienta zvýšené kardiiovaskulární riziko. V klinické praxi se nejčastěji používají EIA metody vyšetření tromboxanů, které jsou však zatíženy značnou variabilitou výsledků, zejména v souvislosti s nejednotným postupem při zpracování vzorků. Perspektivní jsou nové, tzv. přímé metody měření účinku aspirinu, pro které nastává nyní období dalšího vývoje, který povede ke zlepšení a zjednodušení tak, aby bylo možné je využívat rutinně v klinické praxi. V roce 1979 E. Granstrom³⁹ končila svůj článek o problematice měření prostaglandinů a tromboxanů větou, že doba, kdy z jednoho vzorku budeme moci zjistit, zda organismus produkuje nadbytek nebo nedostatek sledované látky, je ještě v nedohlednu. Po téměř 40 letech to už (více či méně) dokážeme a autoři jsou přesvědčeni, že zavedení tzv. přímých metod do rutinní praxe zdaleka nepotrvá dalších 40 let.

Seznam zkratk

AQUA	metoda absolutní kvantifikace proteinů
COX1	cyklooxygenasa-1
COX2	cyklooxygenasa-2
EIA	enzymová imunoanalýza
EMA	European Medicine Agency
NICI	chemická ionizace negativních iontů
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGD ₂	prostaglandin D ₂
PGI ₂	prostaglandin I ₂ (prostacyklin)
PGF ₂	prostaglandin F ₂
RIA	radioimunoanalýza
TXA ₂	tromboxan A ₂
TXB ₂	tromboxan B ₂
11-dehydro-TXB ₂	11-dehydrotromboxan B ₂
2,3-dinor-TXB ₂	2,3-dinor-tromboxanu B ₂
5-LOX	5-lipoxygenasa

LITERATURA

1. Patrono C.: *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 74 (2015).
2. Vane J. R.: *Nat. New Biol.* 25, 232 (1971).
3. Loll P. J., Picot D., Garavito R. M.: *Nat. Struct. Biol.*

- 2, 637 (1995).
4. Patrono C., Ciabattini G., Pugliese F., Pierucci A., Blair I. A., FitzGerald G. A.: *J. Clin. Invest.* 77, 590 (1986).
5. Renda G., De Caterina R.: *Thromb. Haemost.* 108, 6 (2012).
6. Cattella F., Healy D., Lawson J. A., FitzGerald G. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5861 (1986).
7. Cattaneo M.: *Eur. Heart J.* 28, 1673 (2007).
8. Pagliaccia F., Habib A., Pitocco D., Petrucci G., Zaccardi F., Di Stasio E., Rocca B.: *Clin. Lab.* 60, 105 (2014).
9. Committee for Proprietary Medicinal Products, Position Paper on the Regulatory Requirements for the Authorization of Low-Dose Modified Release ASA Formulations in the Secondary Prevention of Cardiovascular Events EMEA/CPMP/EWP/282/02 (CPMP, London, UK, 2002). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003340.pdf, staženo 28.8.2018.
10. Brun C., Daali Y., Combescure C., Zufferey A., Michelson A. D., Fontana P., Reny J. L., Frelinger A. L. 3rd.: *Platelets* 27, 196 (2016).
11. van Diemen J. J. K., Fuijkschot W. W., Spit K., van Reuler A. V. R., Bonten T. N., Numans M. E., van der Bom J. G., Smulders Y. H., Thijs A.: *Thromb. Res.* 163, 1 (2018).
12. Paluch Z., Jedlickova V., Skibova J., Adamek T., Alusik S.: *Int. Angiol.* 26, 206 (2007).
13. Reinke M.: *Am. J. Physiol.* 262, 658 (1992).
14. Takasaki W., Nakagawa A., Tanaka Y., Nakamura K., Shindo H., Hayashi Y., Yamamoto S.: *Thromb. Res.* 63, 331 (1991).
15. Xu Z. H., Jiao J. R., Yang R., Luo B. Y., Wang X. F., Wu F.: *J. Int. Med. Res.* 40, 282 (2012).
16. Kawano K., Sugita M., Fukukava T., Tabata N., Yamamoto K., Hirai A., Tamura Y., Yosida S.: *Jpn. J. Inflam.* 11, 59 (1991).
17. Satoh K., Imaizumi T., Yoshida H., Hiramoto M., Konta A., Takamatsu S.: *Acta Neurol. Scand.* 83, 99 (1991).
18. Achuthan S., Ahluwalia J., Shafiq N., Bhalla A., Pareek A., Chandurkar N., Malhotra S.: *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 20, 174 (2015).
19. Sadilkova L., Paluch Z., Mottlova J., Bednar F., Alusik S.: *Clin. Lab.* 58, 177 (2012).
20. Sadilkova L., Paluch Z., Mottlova J., Bednar F., Alusik S.: *Int. J. Lab. Hematol.* 35, 92 (2013).
21. Katoh K.: *Diabetes Res. Clin. Pract.* 18, 89 (1992).
22. Obase Y., Shimoda T., Matsuo N., Matsuse H., Asai S., Kohno S.: *Chest* 114, 1028 (1998).
23. Santos M. T., Moscardo A., Latorre A., Cortina B., Valles J.: *Platelets* 28, 310 (2017).
24. Eikelboom J. W., Hirsh J., Weitz J. I., Johnston M., Yi Q., Yusuf S.: *Circulation* 105, 1650 (2002).
25. Alušik Š., Jedličková S., Paluch Z., Lejsková M.: *Chem. Listy* 104, 803 (2010).

26. Alusik S., Paluch Z., Lejskova M., Adamek T.: *Int. Angiol.* 29, 255 (2010).
27. Mosorjaková D., Paluch Z., Alušík Š.: *Bratisl. Lek. Listy* 108, 7 (2007).
28. Gurbel P. A., Bliden K. P., DiChiara J., Newcomer J., Weng W., Neerchal N. K., Gesheff T., Chaganti S. K., Etherington A., Tantry U. S.: *Circulation* 115, 3156 (2007).
29. Bhatt D. L. a 11 spoluautorů: *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 603 (2017).
30. Hu Q., Cho M. S., Thiagarajan P., Aung F. M., Sood A. K., Afshar-Kharghan V.: *Platelets* 28, 99 (2016).
31. Dovizio M., Bruno A., Tacconelli S., Patrignani P.: *Recent Results Cancer Res.* 191, 39 (2013).
32. Dzeshka M. S., Shantsila A., Lip G. Y. H.: *Curr. Hypertens. Rep.* 18, 83 (2016).
33. Kakorous N., Gluckman J. T., Conte J. V., Kickler T. S., Laws K., Barton B. A., Rade J. J.: *J. Am. Heart Assoc.* 6, 1 (2017).
34. Wang N., Vendrov K. C., Simmons B. P., Schuck R. N., Stouffer G. A., Lee C. R.: *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 134, 24 (2018).
35. Mesaros C., Blair I. A.: *Clin. Proteomics* 13, 20 (2016).
36. Marcone S., Dervin F., Fitzgerald D. J.: *J. Thromb. Haemostasis* 13, 323 (2015).
37. Patrignani P. a 11 spoluautorů: *J. Thromb. Haemostasis* 12, 1320 (2014).
38. Kovacs E. G., Katona E., Bereczky Z., Homorodi N., Balogh L., Toth E., Peterfy H., Kiss R. G., Edes I., Muszbek L.: *Thromb. Res.* 131, 320 (2013).
39. Granstrom E.: *Ann. Clin. Biochem.* 16, 352 (1979).

T. Adámek^a, Z. Paluch^b, and Š. Alušík^c
 (^a*Department of Internal medicine, Thomayer Hospital, Prague,* ^b*Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Second Faculty of Medicine, Prague,* ^c*Postgraduate Medical School, Chair of Internal Medicine, Prague*): **Difficulties of Thromboxane Production Measurement in Clinical Practice**

The efficacy of antiplatelet therapy with aspirin is assessed by the degree of suppression of thromboxane A₂ or its metabolites. The techniques used most widely in current clinical practice are enzyme immunoassays. However, their results vary considerably depending, in particular, on the technique of sample processing. The authors describe the most often assessed thromboxane A₂ metabolites and the determination of their blood plasma, serum and urine levels. They also discuss the pros and cons of assessing individual thromboxane A₂ metabolites and possible causes of inadequate aspirin-induced thromboxane suppression. The authors also mention novel, so called direct techniques allowing for a direct evidence of cyclooxygenase-1 acetylation, which are becoming reference ones for other techniques.

Keywords: aspirin, cyclooxygenase, thromboxane B₂, 11-dehydrothromboxane B₂, thromboxane A₂