

## Ocena działania tlenu azotu na płytki krwi w trakcie krążenia pozaustrojowego

Evaluation of the effect of nitric oxide on platelets during cardiopulmonary bypass



Szymon Pawlak, Joanna Śliwka, Sławomir Żegleń, Marcin Maruszewski, Jacek Kaczmarski, Adam Grzybowski, Ewa Urbańska, Jacek Pająk, Elżbieta Grygiel, Marian Zembala

Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2012; 3: 314–318

### Streszczenie

Przeprowadzone badanie miało na celu analizę ochronnego wpływu tlenu azotu na płytki krwi. Badaniem objęto 15 pacjentów podzielonych losowo na dwie grupy. W grupie badanej podawano tlenek azotu do układu oksygenatora w stężeniu 10 ppm. Grupa kontrolna była poddana standardowej procedurze. Wszystkim pacjentom pobierano krew w trzech punktach czasowych: przed zabiegiem chirurgicznym, bezpośrednio po zakończeniu zabiegu oraz po upływie co najmniej 24 godzin od operacji kardiologicznej. Wykonano następujące badania: ASPI-test, ADP-test, morfologia oraz oznaczenie agregatów monocytarno-płytkowych – VASP-P, CD41a, CD42a, CD61 – metodą cytometrii przepływową. W przeprowadzonych dotychczas badaniach nie uwidoczono istotnej statystycznie różnicy badanych parametrów pomiędzy grupami.

**Słowa kluczowe:** tlenek azotu, krążenie pozaustrojowe.

### Wstęp

Operacje kardiologiczne przeprowadzane z zastosowaniem techniki krążenia pozaustrojowego są bardzo rozległymi procedurami medycznymi powiązаныmi z relatywnie dużą utratą krwi zarówno w trakcie zabiegu, jak i w okresie pooperacyjnym. Procedury medyczne prowadzące do ograniczenia ilości przetaczanych preparatów krwi mają istotny wpływ na przebieg leczenia pooperacyjnego, a przede wszystkim na szacunkowy czas życia po operacji [1]. W wielu badaniach klinicznych zauważa się wyraźną korelację pomiędzy czasem przeżycia po zabiegach kardiologicznych i ilością utraconej krwi. Jednym z istotniejszych elementów decydujących o utracie krwi w przebiegu operacji kardiologicznych jest uszkodzenie płytek krwi na sztucznych powierzchniach systemów krąże-

### Abstract

The aim of the study was to evaluate the protective effects of nitric oxide on platelets. The study included fifteen patients divided into two random groups. In the test group nitric oxide was added to the oxygenator at a concentration of 10 ppm. The control group was subjected to the standard procedure. In all patients, blood was sampled at three time points: before surgery, immediately after surgery, and at least 24 hours after cardiac surgery. The following tests were performed: ASPI test, ADP test, morphology, indication of platelet monocyte aggregates VASP-P, CD41a, CD42a, CD61 by flow cytometry. There were no statistically significant differences between groups.

**Key words:** nitric oxide, cardiopulmonary bypass.

nia pozaustrojowego [2, 3]. Deficyt ten dotyczy parametrów ilościowych i jakościowych, objawiając się znacznym upośledzeniem funkcji płytek pomimo prawidłowych wartości w badaniu morfologii krwi. Przeprowadzone dotychczas nieliczne badania wpływu tlenu azotu podawanego bezpośrednio do układu pozaustrojowego natleniania krwi sugerują protekcyjny wpływ tego czynnika na funkcję płytek krwi [4–6].

### Cel pracy

Celem pracy jest określenie działania tlenu azotu podawanego do układu natleniania pozaustrojowego w trakcie operacji na otwartym sercu – wymiany zastawki aortalnej. Operacje naprawcze wrodzonych i nabytych wad serca przeprowadzane są z zastosowaniem krążenia po-

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Szymon Pawlak, Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii, Śląskie Centrum Chorób Serca, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, 41-800 Zabrze, tel./faks +48 32 373 36 37, e-mail: pawlaks@poczta.fm

zaustrojowego. W trakcie tych operacji krew jest w pełni heparynizowana tak, aby czas aktywowanego krzepnięcia wynosił powyżej 400 s, i poddawana hemodylucji w celu obniżenia jej lepkości. Podczas krążenia pozaustrojowego krew przepompowywana jest wielokrotnie przez system oksygenatora, ssaków, pompę rolkową i wymiennik ciepła. Wszystkie te elementy są istotnymi czynnikami uszkadzającymi elementy morfotyczne krwi. Bardzo wrażliwe na uszkodzenie w trakcie operacji kardiochirurgicznych są płytki krwi odpowiedzialne za prawidłowe funkcjonowanie układu krzepnięcia i wynikające z tego problemy z uzyskaniem prawidłowej hemostazy po zabiegu. Tym samym jest to potencjalnym czynnikiem ryzyka operacji kardiochirurgicznej. Dotychczas prowadzone badania wpływu tlenu azotu na funkcję płytek krwi opierały się na orientacyjnej ocenie funkcji płytek pacjentów poddanych operacji. Badania te nie były przeprowadzone z randomizacją, a ich wyniki jednoznaczne. W piśmiennictwie można spotkać zarówno opracowania dokumentujące znaczący wpływ, jak i całkowicie negujące działanie tlenu azotu na płytki krwi. W badaniach autorów niniejszej pracy podawano tlenek azotu do układu oksygenatora w dawce terapeutycznej przez czas trwania krążenia pozaustrojowego. Tlenek azotu stosuje się od 9 lat w leczeniu nadciśnienia płucnego u dzieci po korekcjach przeciekowych wad serca i do tej pory nie zanotowano powikłań związanych z jego stosowaniem, mogących być zagrożeniem dla zdrowia leczonych dzieci. W uzupełnieniu do jego wpływu na czynność płytek krwi, ostatnie badania wskazują, że wziewnie podawany tlenek azotu wpływa również na funkcję krążących leukocytów. Z tego powodu jednym z celów niniejszej pracy było zbadanie tworzenia agregatów płytek krwi i leukocytów oraz ekspresji receptorów na powierzchni komórek podczas okresu okołoperacyjnego. Prowadzone badania miały pozwolić na zbadanie funkcji płytek przy zastosowaniu najczulszych metod, takich jak oznaczenie agregatów monocytarno-płytkowych CD41, CD42b, CD61 metodą cytometrii przepływowej oraz za pomocą testów ASPI (ang. *arachidonic acid induced aggregation*) i ADP (ang. *ADP-induced platelet aggregation*).

## Materiał i metody

Do badania włączono pacjentów, którzy zostali zakwalifikowani do operacji kardiochirurgicznej z powodu wady serca i wyrazili zgodę na udział w badaniu, z wyłączeniem pacjentów poniżej 18. roku życia, w stanie krytycznym, przyjmujących leki przeciwplateletowe lub biorących udział w innym programie lekowym. Pacjenci zostali poddani randomizacji

i podzieleni na 2 grupy: grupa badana liczyła 7 osób, grupa kontrolna – 8 osób. Chorzy zostali poddani operacji kardiochirurgicznej w krążeniu pozaustrojowym z powodu wady zastawki aortalnej (razem: 15 osób). Pacjentom z grupy badanej ( $n = 7$ ) podczas krążenia pozaustrojowego podawano dodatkowo tlenek azotu (NO) do układu oksygenatora w dawce terapeutycznej 10 ppm. Grupę kontrolną stanowiło 8 pacjentów poddanych operacji bez podawania tlenu azotu w celu jednoznacznego określenia wpływu operacji na funkcję płytek. Za pomocą cytometrii przepływowej oceniano funkcję płytek krwi poprzez analizę ekspresji CD41, CD42a na płytkach i leukocytach (tworzenie agregatów leukocytarno-płytkowych) w odpowiednich punktach czasowych okresu leczenia: przed zabiegiem chirurgicznym (A), bezpośrednio po zakończeniu zabiegu (B) oraz po upływie co najmniej 24 godzin od operacji kardiochirurgicznej (C). W każdym z trzech badań krew pobierano zgodnie z ustalonym wcześniej protokołem: 2,6 ml krwi z R-hirudyną, 2 ml krwi do próbki na EDTA, 2 ml krwi pobranej do podłoża z cytrynianem sodowym. Ponadto badano zdolność aktywacji płytek – ich reaktywność [w teście VASP-P (ang. *vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation*) – poziom fosforylacji białka VASP] wyrażone jako wskaźnik reaktywności płytek (ang. *platelet reactivity index* – PRI).

Zastosowano następujący zestaw przeciwciał do oznaczeń w metodzie cytometrii przepływowej: CD42a FITC (BD Biosciences), CD41a PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences), VASP (BioCytex, Francja), przeciwciała anty-IgG-FITC + anty-CD61-PE (BioCytex, Francja).

## Wyniki

Uzyskane zgodnie z przedstawionym powyżej protokołem dane przeanalizowano testami statystycznymi (test U Manna-Whitneya) i przedstawiono w postaci tabelarycznej (tab. I–V).

W ASPI-teście nie wykazano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (tab. I). Grupy charakteryzowały się bardzo dużym rozrzutem wyjściowych parametrów. Statystycznie znamienne różnice wykazano jedynie w obrębie grup pomiędzy danymi wyjściowymi i pooperacyjnymi.

W ADP-teście nie wykazano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (tab. II). Grupy charakteryzowały się bardzo dużym rozrzutem wyjściowych parametrów. Statystycznie znamienne różnice wykazano jedynie w obrębie grup pomiędzy danymi wyjściowymi i pooperacyjnymi.

W badaniu morfologicznym również nie wykazano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (tab. III). Sta-

Tab. I. Wyniki pomiarów ASPI-testu (test statystyczny U Manna-Whitneya)

|                 | A        | B        | C       |
|-----------------|----------|----------|---------|
| grupa badana    | 579 ±399 | 384 ±127 | 270 ±30 |
| grupa kontrolna | 516 ±348 | 441 ±319 | 334 ±87 |
| <i>p</i>        | > 0,05   | > 0,05   | > 0,05  |

A – przed zabiegiem chirurgicznym

B – bezpośrednio po zakończeniu zabiegu

C – po upływie 24 godz. od operacji kardiochirurgicznej

**Tab. II.** Wyniki pomiarów ADP-testu (test statystyczny U Manna-Whitneya)

|                 | A        | B        | C        |
|-----------------|----------|----------|----------|
| grupa badana    | 589 ±196 | 514 ±227 | 658 ±453 |
| grupa kontrolna | 670 ±238 | 547 ±283 | 703 ±304 |
| <i>p</i>        | > 0,05   | > 0,05   | > 0,05   |

A – przed zabiegiem chirurgicznym

B – bezpośrednio po zakończeniu zabiegu

C – po upływie 24 godz. od operacji kardiochirurgicznej

**Tab. III.** Wyniki pomiarów liczby płytek krwi (test statystyczny U Manna-Whitneya)

|                 | A               | B               | C               |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| grupa badana    | 237 000 ±53 000 | 152 000 ±79 000 | 183 000 ±82 000 |
| grupa kontrolna | 282 000 ±49 000 | 139 000 ±47 000 | 167 000 ±67 000 |
| <i>p</i>        | > 0,05          | > 0,05          | > 0,05          |

A – przed zabiegiem chirurgicznym

B – bezpośrednio po zakończeniu zabiegu

C – po upływie 24 godz. od operacji kardiochirurgicznej

tystycznie znamienne różnice wykazano jedynie w obrębie grup pomiędzy danymi wyjściowymi i pooperacyjnymi.

Nie wykazano istotnie statystycznej różnicy w zakresie współczynnika reaktywności płytek pomiędzy grupą otrzymującą tlenek azotu a grupą operowanych bez podaży NO w każdym z trzech analizowanych punktów czasowych (tab. IV).

Ekspresja wszystkich analizowanych antygenów (CD61, CD41 i CD42a) zmniejszyła się w okresie B w porównaniu z A i wykazywała tendencję do „normalizacji” ujawnioną w okresie C (tab. V). Analogiczne fluktuacje wykazały obie grupy – badana i kontrolna, jednak zmiany te nie były istotnie statystyczne.

## Dyskusja

Podczas krążenia pozaustrojowego zachodzi wiele zmian funkcjonalnych w populacjach leukocytów i płytek krwi. Wzajemna interakcja pomiędzy leukocytami a płytkami krwi prowadzi do tworzenia heterogennych koagregatów i stanowi mechanizm wzmacniania lokalnej reakcji zapalnej i uszkodzenia tkanek. Agregaty leukocytarno-płytkowe podtrzymują miejscowy proces zapalny, aktywują leukocyty poprzez stymulowanie integryny i adhezji do komórek endotelium.

CD41a jest molekułą adhezji płytek i odpowiada za tworzenie agregatów leukocytarno-płytkowych. CD42a (glikoproteina IX, GP9) znajduje się na powierzchni ludzkich płytek krwi. Wspólnie z glikoproteiną Ib (GP Ib) tworzy

kompleks na błonie płytek, który funkcjonuje jako receptor czynnika von Willebranda. Bierze udział w przekazywaniu sygnału aktywującego płytki.

W pracy dokonano cytometrycznej analizy ekspresji antygenów związanych z aktywacją (CD41a i CD42a) oraz funkcją płytek (PRI – VASP-P). Nie stwierdzono różnic w ekspresji badanych antygenów pomiędzy grupą otrzymującą tlenek azotu a grupą operowanych bez podaży tlenu azotu. Istnieją dane pozostające w sprzeczności z wynikami uzyskanymi przez autorów niniejszej pracy; wskazują one, że ekspresja antygeny CD41 (czynnik adhezyjny płytek) jest zmniejszona na leukocytach chorych poddawanych przestawianiu naczyń wieńcowych, ze znacznego stopnia uszkodzeniem funkcji lewej komory. W cytowanej pracy oceniono, czy podanie nitroprusydku sodu miało działanie cytoprotekcyjne w czasie reperfuzji mięśnia sercowego. Badano ekspresję antygeny w materiale pobranym z tętnicy promieniowej oraz zatoki wieńcowej przed reperfuzją i w jej trakcie. Stwierdzono zmniejszoną ekspresję antygeny CD41 u chorych, u których podawano donor tlenu azotu [1, 7].

Obserwowano zwiększenie liczby monocytów i granulocytów we krwi wieńcowej podczas reperfuzji oraz we krwi obwodowej po zabiegu w porównaniu z pomiarami dokonanymi przed kardioplegią. Dokonano także analizy markerów przyczepności płytek krwi i leukocytów (CD162, CD11b, CD18), stwierdzając znamienne zaburzenia ekspresji molekuł adhezyjnych. Jednocześnie nie stwierdzono zmian

**Tab. IV.** Wyniki pomiarów cytometrycznych PRI [%] (VASP-P)

|                                 | A          | B          | C                          |
|---------------------------------|------------|------------|----------------------------|
| grupa badana ( <i>n</i> = 7)    | 83,0 ±6,44 | 78,5 ±8,56 | 82,5 ±5,34 ( <i>n</i> = 4) |
| grupa kontrolna ( <i>n</i> = 8) | 79,9 ±5,16 | 82,2 ±3,95 | 82,1 ±3,95 ( <i>n</i> = 7) |
| <i>p</i> (test T)               | > 0,05     | > 0,05     | > 0,05                     |

A – przed zabiegiem chirurgicznym

B – bezpośrednio po zakończeniu zabiegu

C – po upływie 24 godz. od operacji kardiochirurgicznej

PRI – współczynnik reaktywności płytek (platelet reactivity index)

Tab. V. Wyniki pomiarów cytometrycznych – płytki (CD61), CD41, CD42a

|                       | A (n = 15)              | B (n = 14)              | C (n = 12)  |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|
| <b>płytki (CD61)</b>  |                         |                         |             |
| grupa badana          | 79,2 ±10,49             | 59,6 ±14,75             | 66,2 ±14,88 |
| grupa kontrolna       | 74,9 ±9,66              | 55,2 ±7,57              | 64,6 ±13,09 |
| p                     | > 0,05                  | > 0,05                  | > 0,05      |
| <b>CD41</b>           |                         |                         |             |
| grupa badana          | 88,6 ±7,91              | 82,6 ±16,8              | 87,7 ±12,55 |
| grupa kontrolna       | 94,6 ±0,83 <sup>†</sup> | 91,9 ±2,85 <sup>†</sup> | 93 ±3,27    |
| p                     | > 0,05*                 | > 0,05*                 | > 0,05      |
| <b>CD42a</b>          |                         |                         |             |
| grupa badana          | 88,4 ±8,05              | 82,6 ±16,71             | 87,6 ±12,5  |
| grupa kontrolna       | 94,4 ±1,53 <sup>†</sup> | 91,5 ±2,41 <sup>†</sup> | 93,3 ±3,03  |
| p                     | > 0,05*                 | > 0,05*                 | > 0,05      |
| <b>CD41 AND CD42a</b> |                         |                         |             |
| grupa badana          | 88,3 ±8,06              | 82,4 ±16,67             | 87,5 ±12,48 |
| grupa kontrolna       | 94,4 ±1,6 <sup>†</sup>  | 91,2 ±2,38 <sup>†</sup> | 92,9 ±3,27  |
| p                     | > 0,05*                 | > 0,05*                 | > 0,05      |

A – przed zabiegiem chirurgicznym

B – bezpośrednio po zakończeniu zabiegu

C – po upływie 24 godz. od operacji kardiochirurgicznej

\* test U Manna-Whitneya

† mediana ± odchylenie kwartylowe

w ekspresji markerów aktywacji płytek (CD41a) przed zabiegiem i po zabiegu [2]. Przeprowadzono także analizę aktywacji płytek podczas zabiegów hemodiafiltracji, która wykazała, że podanie donoru tlenu azotu nie powoduje zmniejszenia stopnia aktywacji płytek – nie stwierdzono większego odsetka agregatów płytkowo-leukocytarnych podczas dializoterapii [3].

Jednym z ważniejszych mechanizmów aktywacji płytek jest mechanizm ADP-zależny. Zdolność aktywacji płytek – ich reaktywność – ocenia się w tzw. teście VASP-P (ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay*) jako poziom fosforylacji białka VASP wyrażony wskaźnikiem reaktywności płytek. Uważa się, że VASP bierze udział w formowaniu konglomeratów płytek z leukocytami. Z kolei, jak wcześniej opisywano, agregaty płytkowo-leukocytarne podtrzymują miejscowy proces zapalny, np. w wyniku niedokrwienia i reperfuzji, przyczyniając się w znacznym stopniu do pogłębiania procesu niszczenia tkanki [4]. Nie stwierdzono zmian w zakresie odpowiedzi płytek na aktywację ADP w badanej grupie chorych.

W czasie korekcji skomplikowanych wad serca krew poddawana jest hemodylucji i heparynizacji celem zmniejszenia jej lepkości, a następnie cała jej objętość przepompowywana jest nieustannie przez układ oksygenatora, pompy, wymiennika ciepła i układu drenów. Istotnym czynnikiem uszkadzającym elementy morfotyczne krwi jest również odsysanie krwi z pola operacyjnego przy użyciu ssaka podciśnieniowego i wprowadzenie jej ponownie do układu płucoserca. Pomimo znacznego postępu w technologii materiałów, z których wykonane są powyższe elementy, ich powierzchnie daleko odbiegają od właściwości

fizjologicznych śródbłonna naczyń krwionośnych i jam serca. Toteż najbardziej podatne na uszkodzenie krwinki płytkowe ulegają znacznemu uszkodzeniu w pierwszej kolejności. W praktyce klinicznej, po długotrwałych zabiegach w krążeniu pozaustrojowym, obserwuje się przedłużające się krwawienia tkankowe mimo precyzyjnie wykonanej hemostazy. W badaniach hematologicznych występuje istotny spadek liczby krwinek płytkowych w stosunku do poziomu sprzed zabiegu. Zmusza to często do przetoczeń preparatów krwiopochodnych: koncentratu krwinek czerwonych w celu zapewnienia prawidłowego utlenowania tkanek, krwinek płytkowych, świeżo mrożonego osocza, krioprecypitatu, a w szczególnych przypadkach także wybranych czynników krzepnięcia. Przetoczenia te, pomijając ich koszt, stanowią również istotny element immunizacji ustroju, której skutków, zwłaszcza odległych, nie jesteśmy w stanie przewidzieć. Szereg dotychczas prowadzonych badań wskazywało na ochronny wpływ tlenu azotu na krwinki płytkowe, w szczególności poprawiając ich odporność na uszkodzenia w czasie kontaktu z нефизjologicznymi powierzchniami. W przeprowadzonych badaniach autorzy niniejszej pracy podawali tlenek azotu do układu oksygenatora w dawce terapeutycznej przez czas trwania krążenia pozaustrojowego.

Autorzy niniejszej pracy chcieli uzyskać odpowiedź na szereg pytań, m.in.: czy podaż tlenu azotu istotnie wpłynie na liczbę krwinek płytkowych po zabiegu w krążeniu pozaustrojowym, jaką wartość efektywności wykażą krwinki płytkowe w teście agregacji płytek po zabiegu w krążeniu pozaustrojowym z zastosowaniem tlenu azotu i bez jego stosowania oraz jakie znaczenie w praktyce klinicznej

będzie miała podaż tlenu azotu w czasie zastosowania krążenia pozaustrojowego?

### Wnioski

W przeprowadzonej analizie nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą pacjentów poddanych działaniu tlenu azotu i grupą kontrolną. Zaobserwowano jedynie zmiany badanych parametrów przed- i pooperacyjnych. W świetle przeprowadzonych badań pomimo braku ich znaczącości statystycznej wydaje się, że ekspresja antygenów świadczących o aktywacji płytek jest mniejsza w grupie, w której podawano tlenek azotu do oksygenatora.

*Projekt finansowany z pracy statutowej nr KNW-1-178/09 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.*

### Piśmiennictwo

1. Cheung PY, Sawicki G, Salas E, Etches PC, Schulz R, Radomski MW. The mechanisms of platelet dysfunction during extracorporeal membrane oxygenation in critically ill neonates. *Crit Care Med* 2000; 28: 2584-2590.
1. Mellgren K, Friberg LG, Mellgren G, Hedner T, Wennmalm A, Wadenvik H. Nitric oxide in the oxygenator sweep gas reduces platelet activation during experimental perfusion. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1194-1198.
2. Urbańska E, Grzybowski A, Haponiuk I, Przybylski R, Walas W, Stempniewicz K, Szary T, Włoczka G, Skalski JH, Zembala M. Zastosowanie pozaustrojowego utleniania krwi (ECMO) u noworodków. *Anest Int Ter* 2001; 33: 101-106.
3. McMullan DM, Bekker JM, Johengen MJ, Hendricks-Munoz K, Gerrets R, Black SM, Fineman JR. Inhaled nitric oxide-induced rebound pulmonary hypertension: role for endothelin-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H777-H785.
4. Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation* 2000; 102: 2781-2791.
5. Cheung PY, Sawicki G, Peliowski A, Etches PC, Schulz R, Radomski MW. Inhaled nitric oxide inhibits the release of matrix metalloproteinase-2, but not platelet activation, during extracorporeal membrane oxygenation in adult. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 534-538.
6. Sbrana S, Buffa M, Bevilacqua S, Spiller D, Parri MS, Gianetti J, De Filippis R, Clerico A. Granulocyte- and monocyte-platelet adhesion index in coronary and peripheral blood after extracorporeal circulation and reperfusion. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 215-222.