

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Mgr. Martin Řádek

Stanovení exprese markerů aktivace krevních destiček v patofyziologii trombotických stavů

Determination of platelet activation markers expression in the pathophysiology of thrombotic states

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 8.12.2021

Martin Řádek

Poděkování:

V první řadě bych rád poděkoval mému školiteli panu doc. MUDr. Tomáši Kvasničkovi, CSc. za jeho odborné vedení, pomoc a připomínky při psaní této práce.

Dále bych rád vyslovil obrovské poděkování panu prof. MUDr. Janu Kvasničkovi, DrSc. za umožnění věnovat se tomuto oboru a za jeho cenné rady při řešení tématu.

Velký dík patří panu prim. MUDr. Martinu Špačkovi, PhD. za jeho podporu, rady a pomoc nejen při psaní této dizertační práce.

Také bych rád poděkoval všem kolegům z Centrálních hematologických laboratoří a Trombotického centra za dlouhodobou spolupráci, zejména bych chtěl poděkovat MUDr. Josefu Karbanovi, CSc., Mgr. Ivaně Malíkové a RNDr. Evě Babuňkové, bez jejichž pomoci a podpory by tato práce nemohla vzniknout.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu, a hlavně své partnerce Zlatě Šustrové za nekonečnou podporu a trpělivost, kterou se mnou má nejen během psaní této práce.

Identifikační záznam:

ŘÁDEK, Martin. *Stanovení exprese markerů aktivace krevních destiček v patofyziologii trombotických stavů. [Determination of expression platelets activation markers in pathophysiology of thrombophilia]*. Praha, 2021, 70 s., 6 příl. Dizertační práce (PhD.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Školitel Kvasnička Tomáš.

Abstrakt

Úvod/Cíle: Trombofilie, tedy zvýšená dispozice ke vzniku žilní a arteriální trombózy představuje komplexní onemocnění zapříčiněné mimo jiné i poruchami krevních destiček a endotelu. Cirkulující endotelové buňky (CEC) a endotelové progenitorové buňky (EPC) jsou popisovány jako markery poškození a dysfunkce endotelu, respektive jako markery jeho obnovy u mnoha nemocí, včetně trombotických komplikací. Jejich význam u pacientů se známou trombofilií však dosud ještě nebyl zkoumán. CEC i EPC představují extrémně vzácné buněčné populace vyskytující se v periferní krvi. Proto k jejich identifikaci a kvantifikaci je použití výhradně standardizovaných a citlivých metod zcela nezbytné. Cílem práce bylo identifikovat a kvantifikovat CEC a EPC v periferní krvi pacientů s vrozenými trombofiliemi a zhodnotit jejich význam jako markerů aktivity endotelu a krevních destiček v souvislosti s rizikem vzniku či rekurence trombózy.

Metody: Analýza počtu CEC a EPC v periferní krvi pacientů s trombofiliemi s nebo bez historie trombózy a pacientů s akutní trombózou byla provedena metodou vícebarevné průtokové cytometrie. Referenční hodnoty CEC a EPC byly stanoveny na skupině zdravých kontrol. Pacienti s hematologickými malignitami po vysokých dávkách chemoterapie a pacienti s akutním infarktem myokardu byli použiti jako pozitivní kontrola.

Výsledky: Imunofenotyp CEC a EPC byl stanoven jako CD45 negativní až slabě pozitivní, CD34 silně pozitivní, CD146 pozitivní, CD31 pozitivní a CD133 negativní, respektive CD133 pozitivní. Zvýšené hladiny endoteliálních buněčných subpopulací byly potvrzeny u pozitivní patientské skupiny. Ve srovnání se zdravými kontrolami nebyly detekovány žádné významné změny v počtech CEC nebo EPC u pacientů s trombofiliemi ani u pacientů s akutní trombózou.

Závěr: V rámci této práce optimalizovaná metoda vícebarevné průtokové cytometrie umožňuje jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci endotelových buněk v periferní krvi. Zjištěné výsledky podporují dřívější studie ukazující, že zvýšené hladiny CEC by mohly sloužit jako indikátor poškození a dysfunkce endotelu. Normální hladiny CEC a EPC byly stanoveny u pacientů s vrozenými trombofiliemi.

Klíčová slova: trombofilie, trombóza, cirkulující endotelové buňky, endotelové progenitorové buňky, vícebarevná průtoková cytometrie, krevní destičky

Abstract

Background/Aims: Thrombophilia, ie an increased predisposition to venous and arterial thrombosis, is a complex disease caused by disorders of platelets and endothelial, among others. Circulating endothelial cells (CEC) and endothelial progenitor cells (EPC) have been described as markers of endothelial damage and dysfunction, respectively as markers of its recovery in many diseases, including thrombotic complications. However, their significance in patients with known thrombophilia has not yet been investigated. Both CEC and EPC represent extremely rare cell populations found in peripheral blood. Therefore, it is essential to use exclusively standardized and sensitive methods for their identification and quantification. The aim of the study was to identify and quantify CEC and EPC in the peripheral blood of patients with congenital thrombophilia and to evaluate their importance as markers of endothelial and platelet activity in context with the risk of thrombosis occurring and recurrence. **Methods:** Analysis of the number of CEC and EPC in the peripheral blood of patients with thrombophilia with or without a history of thrombosis and patients with acute thrombosis was performed by multicolor flow cytometry. The CEC and EPC reference values were determined on a group of healthy controls. Patients with hematological malignancies after high-dose chemotherapy and patients with acute myocardial infarction were used as positive controls. **Results:** CEC and EPC immunophenotypes were determined as CD45 negative to weakly positive, CD34 strongly positive, CD146 positive, CD31 positive and CD133 negative, respectively CD133 positive. Elevated levels of endothelial cell subpopulations were confirmed in a positive patient group. No significant changes in CEC or EPC counts were detected in patients with thrombophilia or in patients with acute thrombosis compared to healthy controls. **Conclusion:** In this work, the optimized method of multicolor flow cytometry allows unambiguous identification and quantification of endothelial cells in the peripheral blood. The results support previous studies showing that elevated CEC levels could serve as an indicator of endothelial damage and dysfunction. Normal CEC and EPC levels were determined in patients with congenital thrombophilia.

Keywords: thrombophilia, thrombosis, circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, multicolor flow cytometry, platelets

Obsah

Seznam zkratek	9
1. Úvod	13
1.1. Trombotické stavy	13
1.1.1. Žilní tromboembolizmus	13
1.1.2. Arteriální trombóza	14
1.2. Trombofilie	15
1.2.1. Primární trombofilie	15
1.2.2. Sekundární trombofilie	18
1.3. Laboratorní vyšetření k vyloučení trombofilií	20
1.4. Krevní destičky v patofyziologii trombotických stavů	21
1.5. Vztah endotelu a krevních destiček v patofyziologii trombotických stavů	24
1.6. Endotelové buňky v krevní cirkulaci	26
1.6.1. Cirkulující endotelové buňky	26
1.6.2. Endotelové progenitorové buňky	29
1.7. Stanovení endotelových buněk od mikroskopie k průtokové cytometrii	33
2. Vědecká hypotéza a cíle práce	38
2.1. Vědecká hypotéza	38
2.2. Cíle práce	38
3. Materiál a metody	40
3.1. Soubor pacientů a kontrolních skupin	40
3.2. Odběr biologického materiálu	40
3.3. Analýza krevního obrazu	40
3.4. Analýza na průtokovém cytometru	41

3.4.1. Příprava vzorků k měření na průtokové cytometru	42
3.4.2. Výběr liniově specifického endoteliálního znaku	43
3.4.3. Postup gatování a identifikace endotelových buněk a jejich subpopulací	45
3.5. Výpočet absolutního zastoupení subpopulací endotelových buněk v cirkulaci	49
3.6. Statistická analýza	49
4. Výsledky	50
4.1. Stanovení imunofenotypu endotelových buněčných subpopulací	50
4.2. Stanovení referenčních hodnot CEC a EPC	52
4.3. Stanovení hodnot CEC a EPC u pacientů s vrozenou trombofilií	53
4.4. Stanovení hodnot CEC a EPC u pacientů s akutní trombózou	54
4.5. Stanovení hodnot CEC a EPC u skupiny kontrolních pacientů	54
5. Diskuze	55
6. Závěry	60
7. Shrnutí závěrů	61
8. Dedikace	62
9. Seznam použité literatury	63
10. Seznam příloh	73

Seznam zkratek

AA – arachidonová kyselina (*z angl. arachidonic acid*)

ADP – adenzin difosfát (*adenosine diphosphate*)

ANCA – anti-neutrofilní cytoplazmatické protilátky (*anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

APC – aktivovaný protein C (*activated protein C*)

APC – alofykocyanin (*allophycocyanin*)

APTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas (*activated partial thromboplastin time*)

BMEC – z kostní dřeně odvozené endotelové buňky (*bone marrow-derived endothelial cells*)

CAC – cirkulující angiogenní buňky (*circulating angiogenic cells*)

CD – diferenční skupina (*cluster of differentiation*)

CEC – cirkulující endotelové buňky (*circulating endothelial cells*)

CEP – cirkulující endotelové progenitory (*circulating endothelial progenitors*)

COX – cyklooxygenáza (*cyclooxygenase*)

CRP – C-reaktivní protein (*C-reactive protein*)

DC – dendritická buňka (*dendritic cell*)

DTS – denzní tubulární systém (*dense tubular system*)

ECFC – buňky vytvářející endotelové kolonie (*endothelial colony-forming cells*)

eEPC – brzké endotelové progenitorové buňky (*early endothelial progenitor cells*)

EPC – endotelové progenitorové buňky (*endothelial progenitor cells*)

FACS – fluorescenčně aktivované třídění buněk (*fluorescence activated cell sorting*)

FcR – Fc receptor (*Fc receptor*)

FGF – růstový faktor fibroblastů (*fibroblast growth factor*)

FITC – fluoresceinizothiokyanát (*fluorescein isothiocyanate*)

FSC-A / H – dopředný rozptyl-plocha / výška (*forward scatter-area / height*)

G-CSF – faktor stimulující kolonie granulocytů (*granulocyte colony-stimulating factor*)

GP – glykoprotein (*glycoprotein*)

HSC – hematopoetické kmenové buňky (*haematopoietic stem cells*)

ICAM-1 – mezibuněčná adhezní molekula typu 1 (*intercellular adhesion molecule-1*)

IL – interleukin (*interleukin*)

IP₃R – receptor inozitol trifostátu (*Inositol trisphosphate receptor*)

ITAM – imunoreceptorový aktivační motiv na bázi tyrozínu (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

KDR – receptor kinázové inzertní domény (*kinase insert domain receptor*)

LA – lupus antikoagulans (*lupus anticoagulant*)

IEPC – pozdní endotelové progenitorové buňky (*late endothelial progenitors*)

LoD – limit detekce (*limit of detection*)

Mac-1 – makrofágová adhezní molekula-1 (*macrophage adhesion molecule-1*)

MCP-1 – monocytární chemotaktický protein-1 (*monocyte chemotactic protein-1*)

MMPs – matrixová metaloproteináza (*matrix metalloproteinase*)

MRD – minimální reziduální nemoc (*minimal residual disease*)

MTHFR – methylenetetrahydrofolát reduktáza (*methylenetetrahydrofolate reductase*)

NF-κB – nukleární faktor kappa B buněk (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NO – oxid dusnatý (*nitric oxide*)

OEC – rostoucí endotelové buňky (*outgrowth endothelial cells*)

PAF – faktor aktivující krevní destičky (*platelet activating factor*)

PAI-1 – inhibitor aktivátoru plazminogenu typu 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*)

PAR – proteázou aktivovaný receptor (*protease-activated receptor*)

PE – fykoerytrin (*phycoerythrin*)

PECAM-1 – molekula adheze trombocytů a endotelu typu 1 (*platelet-endothelial adhesion molecule-1*)

PE-Cy7 – fykoerytrin cyanin 7 (*phycoerythrin cyanin 7*)

PerCP-Cy5.5 – peridinin-chlorofyl-protein cyanin 5.5 (*peridinin-chlorophyll-protein cyanin 5.5*)

PF 4 – faktor 4 krevních destiček (*platelet factor-4*)

PFA – test funkce krevních destiček (*platelet function assay*)

PGH₂ / I₂ – prostaglandin H₂ / I₂ (*prostaglandin H₂ / I₂*)

PLA₂ – fosfolipáza A₂ (*phospholipase A₂*)

PSGL-1 – P-selektinový glykoproteinový ligand-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*)

PT – protrombinový čas (*prothrombin time*)

RANTES – chemokin RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted*)

ROS – reaktivní kyslík (*reactive oxygen species*)

SDF-1 – faktor 1 odvozený ze stromálních buněk (*stromal cell-derived factor-1*)

SSC-A / H – boční rozptyl-plocha / výška (*side scatter-area / height*)

TAFI – trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (*trombin activated fibrinolysis inhibitor*)

TF – tkáňový faktor (*tissue factor*)

TM – trombomodulin (*thrombomodulin*)

TNF – faktor nádorové nekrózy (*tumor necrosis factor*)

t-PA – aktivátor tkáňového plazminogenu (*tissue plasminogen activator*)

TT – trombinový čas (*thrombin time*)

TXA₂ – tromboxan A₂ (*thromboxane A₂*)

u-PA – urokináza (*urokinase*)

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

VCAM-1 – molekula adheze vaskulárních buněk typu 1 (*vascular cell adhesion molecule-1*)

VTE – žilní tromboembolizmus (*venous thromboembolism*)

vWF – von Willebrandtův faktor (*von Willebrandt factor*)

1. Úvod

1.1. Trombotické stavy

Fyziologickým procesem, který udržuje tok krve a chrání tak organismus před ztrátou krve po poranění cévní stěny, je hemostáza. Pro správný chod tohoto procesu jsou jednak nezbytné buněčné komponenty, tj. krevní destičky, leukocyty, endotelové buňky a za druhé koagulační proteiny přítomné v plazmě. Tento systém je schopný se při poranění cévní stěny rychle aktivovat a vytvořit krevní sraženinu neboli trombus, který ji zacelí. Vznik trombu byl poprvé uceleně popsán v roce 1856, kdy profesor Virchow postuloval tři hlavní faktory, které přispívají ke vzniku trombu, poruchu krevního toku, postižení cévní stěny a hyperkoagulaci. Koncepce Virchowovy triády se v zásadě uplatňuje dodnes. Naproti tomu trombotické stavy jsou patofyziologické stavy, při kterých může docházet k uvolnění trombů neboli embolů, což může v konečném důsledku vést až k tromboembolické příhodě. Na základě místa vzniku rozlišujeme trombózy žilní a arteriální (Kvasnička, 2003a).

1.1.1. Žilní tromboembolizmus

Žilní tromboembolizmus zahrnující hlubokou žilní trombózu a plicní embolii představuje velké zdravotnické a sociálně-ekonomické riziko, které souvisí s vysokou mírou morbidit a mortality v ekonomicky rozvinutých zemích. Ke zvýšení nemocnosti přispívá i posttrombotický syndrom. Zároveň se jedná se o jednu z nejčastějších příčin kardiovaskulárních úmrtí po infarktu myokardu a ischemické cévní mozkové příhodě (Kvasnička, 2003a, Behraves et al., 2017). Na základě evropské studie bylo zjištěno více než jeden milion symptomatických příhod souvisejících s žilním tromboembolizmem, přičemž třetina z nich bylo fatálních (Cohen et al., 2007). V České republice je diagnostikováno cca 15–25 tisíc případů žilní trombózy ročně. Situaci zhoršuje i druhotný tromboembolizmus, který roste s narůstajícím počtem nádorových onemocnění či masové rozšíření některých protrombofilních medikací (např. hormonální antikoncepce) bez vyšetření tendence k hyperkoagulaci.

Na příčině vzniku žilní trombózy se z Virchowova trias podílejí především dva faktory, tj. zpomalení až zástava žilního průtoku (stáza) a hyperkoagulace, tedy neregulovaná aktivace koagulačního systému. Ke stáze může docházet v cípech žilních chlopní dolních

končetin, z důvodu mechanických překážek v žilním řečišti, tlakem na žíly například přiléhajícím nádorem, cystou či hematomem, nebo imobilizací po operacích či dlouhodobém cestování. Stagnací průtoku krve dochází k lokálnímu navýšení koncentrace koagulačních plazmatických faktorů a leukocytů, které začnou uvolňovat zánětlivé cytokiny, což přispívá k protrombotické aktivaci žilní výstelky. Tento proces vede až k hyperkoagulaci, která je způsobena jednak selháním inhibitorů koagulace a nedostatečnou funkcí fibrinolytického systému a zároveň také zvýšenou prokoagulační aktivitou v krvi, a právě změnou stavu žilního endotelu na prozánětlivý a protrombotický (Kvasnička, 2003a).

1.1.2. Arteriální trombóza

Arteriální trombóza je v současné době jedna z nejčastějších smrtících chorob, která navíc významně zhoršuje prognózu pacienta na přežití. Tento patologický proces postihuje velké a střední artérie, zejména v koronární a mozkové cirkulaci, přičemž se klinicky projevuje především jako akutní koronární syndrom, cévní mozková nebo jiná cévní příhoda (Jackson, 2011, Kvasnička, 2012). Aterotrombotická onemocnění jsou zodpovědná za více než 25 % všech úmrtí na světě, přičemž jsou považována za nemoc především rozvojových zemí, ve kterých prevalence těchto nemocí stále stoupá. Přestože v posledních 40 letech jsou vyvíjena stále účinnější antitrombotika, je jejich vliv na úmrtnost stále velmi malý a pouze čtvrtina pacientů na antitrombotické terapii se vyhne fatálním trombotickým příhodám. Tento stav se vzhledem k rostoucímu výskytu cukrovky, obezity a metabolickému syndromu může v budoucnu nadále zhoršovat (Jackson, 2011).

Z hlediska klasické Virchowovy triády se na vzniku arteriálního trombu zpočátku podílejí pouze dva faktory, tj. agregace krevních destiček a dysfunkce cévního endotelu, a to zejména při ateroskleróze. Nejprve totiž dochází pouze ke shlukování krevních destiček a leukocytů, tedy vzniku bílého trombu. Červené krvinky a plazmatické koagulační faktory jsou pod tlakem krve vymývány. Tato trombogeneze nastává v důsledku poranění cévní stěny a následného odhalení vysoce trombogenních kolagenních vláken, což může být způsobeno například rupturou aterosklerotického plátu. Až druhotně během obturace artérie nebo krvácení dovnitř prasklého plátu dochází k hyperkoagulaci, podobně jako je tomu u žilní trombózy a vzniku červeného trombu (Kvasnička, 2003a).

1.2. Trombofilie

Za trombofilii lze obecně považovat stav zvýšené dispozice k tvorbě trombů v žilním nebo tepenném systému. Jako trombofilní nelze chápat pouze stavy spojené s hyperkoagulací, jako tomu bylo v minulosti, ale jako komplexní onemocnění zapříčiněné jednak poruchami koagulace a jejich inhibitorů a za druhé jako protrombotické stavy způsobené přirozenými (geneticky závislými) nebo získanými poruchami krevních destiček, leukocytů, endotelu, zánětlivých cytokinů, metabolismu atd (Kvasnička, 2003a). Zároveň jsou tyto stavy kombinovány se spouštěcími podněty pro trombózu, jako jsou například operace, imobilita, dehydratace, nádory, patologická gravidita aj. Jedná se tedy o multifaktoriální onemocnění (Margaglione and Grandone, 2011). Z hlediska klinické praxe je zásadní patologické trombofilie včas diagnostikovat, tím získat čas pro vhodnou profylaxi a zabránit tak vzniku nebo rekurenci trombózy. Komplikace s již vzniklou trombotizací jsou totiž vždy částečně nevratné a léčebný postup je nákladnější a méně účinný (Kvasnička, 2003a).

K včasné diagnostice trombofilií je samozřejmě nutné vědět, jaké příčiny vedou k jejich vzniku. V případě obou trombofilií, žilní i tepenné, působí mnoho faktorů, přičemž u žilní jsou spojené především se zástavou krve a hyperkoagulací související s abnormalitami koagulačních faktorů, zatímco u tepenné s aktivací krevních destiček, dysfunkcí endotelu a částečně s abnormalitami fibrinolytického systému (Kvasnička, 2003a, Foy and Moll, 2009). Trombofilie můžeme rozdělit na primární neboli vrozené, tedy geneticky podmíněné mutací či polymorfizmem na úrovni genu a na sekundární, tj. získané, kdy k výše zmíněným změnám dochází v rámci nějakého fyziologického či patofyziologického stavu (Kvasnička, 2003a).

1.2.1. Primární trombofilie

Vrozené trombofilie představují dobře zavedené predisponující faktory žilního tromboembolizmu, nicméně v některých případech (například hyperfibrinogémie, hyperhomocysteinémie, faktor V Leiden, mutace genu pro trombomodulin a polymorfizmy genů různých trombocytárních glykoproteinů) byla prokázána jejich asociace s arteriální trombózou (Chiasakul et al., 2019, Kvasnička, 2003b). Podle jejich příčiny lze primární trombofilie rozdělit na:

Trombofilie při zvýšené koncentraci koagulačních faktorů a inhibitorů fibrinolýzy:

- **Zvýšení protrombinu:** Mutace v genu pro protrombin spočívá v náhradě guaninu za adenin na pozici 20210, což u heterozygotů vede k nárůstu produkce protrombinu na více než 130 %. Tito nositelé vykazují asi třikrát vyšší riziko vzniku žilní trombózy (Poort et al., 1996, Kvasnička, 2003a). Výskyt mutace genu pro protrombin v České republice představuje 1,3 % populace (Kvasnicka et al., 2014).
- **Zvýšení faktoru VIII:** Primární zvýšení (nad 150 %) hladiny faktoru VIII se vyskytuje u 11 % populace a u 25 % s prokázanou žilní trombózou, přičemž riziko vzniku žilní trombózy je zvýšeno asi šestkrát. Hladina faktoru VIII je ovlivněna také zánětem (Kyrle et al., 2000, Kvasnička, 2003a).
- **Zvýšení faktoru IX:** Zvýšená hladina faktoru IX (více než 290 %) je odhadována u 10 % populace, přičemž riziko žilního tromboembolizmu je pak dvakrát až třikrát vyšší (van Hylckama Vlieg et al., 2000).
- **Zvýšení faktoru XI:** Zvýšená hladina faktoru XI se v populaci vyskytuje asi u 10 % (Meijers et al., 2000).
- **Zvýšení fibrinogenu:** Hyperfibrinogémie zjištěná u osob s polymorfizmem G 455-A genu pro β řetězec fibrinogenu představuje rizikový faktor pro žilní i arteriální trombózu (Tybjaerg-Hansen et al., 1997, Kvasnička, 2003a).
- **Zvýšení inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1:** Stanovení polymorfizmu genu pro inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) představuje spolehlivý marker aterotrombózy. Zvýšená hladina PAI-1 (o 25 %) je pozorována u jedinců s polymorfizmem PAI-1: 4G/4G oproti genotypu PAI-1: 5G/5G. Zvýšené riziko vzniku trombóz je spojeno s výskytem dalších rizikových faktorů (faktor V Leiden, antifosfolipidový syndrom) (Sartori et al., 2003, Kvasnička, 2003a).

Trombofilie při porušené regulaci hemokoagulace:

- **Deficit antitrombinu:** Nedostatek antitrombinu se v populaci vyskytuje pouze u 0,02 % osob a příčinu hluboké žilní trombózy představuje v 1 % případů, nicméně průběh onemocnění je závažnější (Beauchamp et al., 2000).
- **Deficit nebo dysfunkce proteinu C:** Riziko vzniku žilní trombózy je u osob s deficitem proteinu C asi desetkrát vyšší oproti těm, kteří vykazují normální

hladiny, přičemž výskyt deficitu proteinu C v populaci činí asi 0,2 – 0,4 % (Kvasnička, 2003a).

- **Deficit nebo dysfunkce proteinu S:** Nedostatek proteinu S se vyskytuje u 1 – 5 % pacientů se žilní trombózou. Predispozice k žilní trombotizaci je u heterozygotů s deficitem proteinu S pětikrát až desetkrát vyšší oproti osobám s normálními hladinami proteinu S (Kvasnička, 2003a).
- **Dysfunkce trombomodulinu:** Mutace genu pro trombomodulin 127 G-A Ala 25 Thr způsobuje ztrátu jeho inhibiční funkce na trombin, a proto se tak relativní riziko vzniku arteriální trombózy zvyšuje až sedmkrát (Doggen et al., 1998).
- **APC rezistence:** Jedná se zejména o žilní a částečně i arteriální trombofilii vyvolanou rezistencí faktoru V^a vůči vlivu aktivovaného proteinu C. Tato rezistence je způsobena bodovou mutací v kodonu 506 (F5G1691A) faktoru V, která se dle místa objevení nazývá leidská (Dahlback, 1999, Bertina et al., 1994). Přestože APC rezistence způsobená faktorem V Leiden představuje nejčastější vrozený hyperkoagulační stav a riziko vzniku hluboké žilní trombózy je až sedmkrát vyšší a čtyřikrát až pětikrát vyšší je její rekurence, tak k trombózám u heterozygotů dochází až v kombinaci s dalšími protrombotickými riziky (obezita, imobilizace, patologické těhotenství atd.) (Kvasnička, 2003a). V České republice se heterozygotní mutace faktoru V Leiden vyskytuje u 4,5 % populace a počet homozygotů faktoru V Leiden činí jeden na pět tisíc obyvatel (Kvasnicka et al., 2014).

Trombofilie při dysfunkci nebo nedostatku některých koagulačních faktorů:

- **Dysfibrinogémie:** Dysfibrinogémie může být způsobena mutacemi ve třech genech řetězce A α , B β a γ . Asymptomatických je asi 55 % objevených mutací, 25 % vyvolává krvácení a u 20 % byla zjištěna tendence k tvorbě trombů (Marchi et al., 2000, Tarumi et al., 2000, Kvasnička, 2003a).
- **Dysfunkce faktoru XIII:** Vyšší riziko embolizace, které je zapříčiněné nestabilní fibrinovou sraženinou může být způsobena polymorfizmem faktoru XIII Val – 34 Val a jeho následnou dysfunkcí (Catto et al., 1999).

Trombofilie při polymorfizmu glykoproteinů (GP) na krevních destičkách:

- **Polymorfismus GP Iba:** Dva polymorfizmy GP Iba s genotypem C/B jsou silně asociovány s rizikem akutních srdečních infarktů a mozkových mrtvic, ale ne s hlubokou žilní trombózou (Gonzalez-Conejero et al., 1998).
- **Polymorfismus GP Ia/IIa:** Prevalence homozygotů s polymorfizmem GP Ia/IIa s genotypem 807T/873A je asi třikrát vyšší u pacientů s akutním infarktem myokardu (Moshfegh et al., 1999).
- **Polymorfismus GP IIIa:** PLA2 polymorfismus glykoproteinu IIIa má významně vyšší prevalenci u pacientů, kteří podstoupili perkutánní koronární intervenci a představuje tak závažný rizikový faktor aterotrombotických komplikací (Garcia-Ribes et al., 1998).
- **Polymorfismus GP VI:** Glykoprotein VI představuje receptor krevních destiček, který má hlavní roli v kolagenem indukované signalizaci (Riba et al., 2005). Byl identifikován polymorfismus GP VI (T13254C), který v kombinaci s dalšími rizikovými faktory může zvyšovat riziko vzniku koronární trombózy (Ollikainen et al., 2004, Motovska et al., 2010, Croft et al., 2001).

Trombofilie při metabolických poruchách:

- **Hyperhomocysteinémie:** Zvýšené hladiny homocysteinu jsou primárně vyvolány mutací genu pro protein cystathion beta-syntázu nebo metylen tetrahydrofolát reduktázu (MTHFR), tím dochází k blokování metabolizmu methioninu i homocysteinu. Mutace MTHFR (C 677 T) se v homozygotní formě vyskytuje až u 8-10 % osob kavkazské populace. Riziko trombózy je patrné až s přítomností sekundárních rizik (Frosst et al., 1995, Kvasnička, 2003a).

1.2.2. Sekundární trombofilie

Rizikové trombofilie, které mají tendenci k tvorbě nebo rekurenci trombóz a jsou zapříčiněny zvýšením koagulačních faktorů nebo inhibitorů fibrinolýzy, metabolickými poruchami nebo autoprotilátkami mohou být způsobeny také druhotně v rámci určitých fyziologických či patofyziologických stavů (Kvasnička, 2003a). Tyto získané trombofilie mohou vznikat v následujících situacích:

- **Těhotenství:** U gravidních žen se vlivem estrogenů ve druhém až třetím trimestru objevují zvýšené hladiny koagulačních faktorů (F VII, F VIII, protrombin, F X, F IX, F XI a fibrinogen) a inhibitorů fibrinolýzy (PAI-1, PAI-2, TAFI) (Colman et al., 1995). Při fyziologickém těhotenství však vlivem přirozených kontrolních mechanismů těla k trombotizaci prakticky nedochází a riziko tromboembolie je vyšší až po porodu v šestinedělí. Riziko trombóz je vyšší při patologické graviditě nebo při současné přítomnosti některých vrozených trombofilií, v těchto případech se doporučuje dispenzarizace, případně profylaxe nízkomolekulárními hepariny (Kvasnička, 2003a).
- **Zánět:** Zánětlivé reakce, ke kterým dochází při infekcích, traumatech nebo po operacích (hojivá reakce) jsou spojené s uvolňováním zánětlivých cytokinů (IL-6) a produkcí pozitivních proteinů akutní fáze (CRP, fibrinogen, F VII, F VIII, PAI-1) (Gabay and Kushner, 1999), jejichž zvýšená koncentrace v krvi podporuje rozvoj trombofilie. Na místě je tak v pooperačním průběhu podávání profylaktických dávek nízkomolekulárního heparinu (Kvasnička, 2003a). Sledování hladin zánětlivého cytokinu IL-6 a proteinů akutní fáze u osob s dřívější historií žilního tromboembolizmu tak představuje validní ukazatel rekurence žilní trombózy (van Aken et al., 2000).
- **Nádorová onemocnění:** Při maligních procesech dochází ke zvýšené produkci zánětlivého cytokinu TNF- α a tkáňového faktoru, což vede k trombofilním projevům. Zároveň probíhá aktivace trombinu a tvorba fibrinu, které společně s aktivací endotelu, leukocytů a krevních destiček potencují prokoagulační účinek nádorových buněk. Nádorová onemocnění tak mohou být doprovázena hlubokou žilní trombózou, a proto i zde je doporučována profylaxe nízkomolekulárními hepariny (Kvasnička, 2003a).
- **Zvýšení lipoproteinu (a):** Zvýšené hladiny lipoproteinu (a) skládajícího se ze složky bílkovinného nosiče apolipoproteinu (a) a lipoproteinu o nízké hustotě LDL pozorované například při ateroskleróze způsobují inhibici fibrinolýzy. Děje se tak kompeticí mezi plazminogenem a právě apolipoproteinem (a) o vazbu na povrch endotelu, přičemž nadbytek lipoproteinu (a) brání dostatečné tvorbě plazminu. Zvýšené hladiny lipoproteinu (a) jsou proto spojovány s antifibrinolytickými i aterogenními účinky (Caplice et al., 2001, Kvasnička, 2003a).

- **Antifosfolipidový syndrom:** Antifosfolipidový syndrom představuje autoimunitní onemocnění, které je vyvoláno autoprotilátkami proti negativně nabitým fosfolipidům přítomným na povrchu krevních destiček a endotelu. Tyto autoprotilátky jsou tvořeny zejména imunoglobuliny třídy IgG nebo IgM nebo jejich kombinací a jsou označovány jako lupus antikoagulans (LA), neboť se u pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE) projevuje prodloužením testu APTT. LA autoprotilátky se vyskytují asi u 30 % nemocných se SLE, ale vyskytují se i u jiných systémových chorob pojiva nebo u pacientů s malignitami. Přítomnost LA bývá také často příčinou spontánních potratů. Klinicky se antifosfolipidový syndrom projevuje heterogenně. Nejčastěji při něm dochází k trombotickým příhodám, přičemž v 60 % se jedná o žilní trombózy, ve 30 % o cévní mozkové příhody a v 10 % o jiné arteriální trombózy. Při antifosfolipidovém syndromu dochází k reakci LA s fosfolipidy krevních destiček a endotelu, které se tak aktivují. To se projevuje jednak inhibicí ochranného antitrombotického vlivu annexinu V, zvýšením aktivity trombinu a také zvýšenou expresí adhezivních molekul na povrchu endotelu, čímž dochází k zachytávání a aktivaci leukocytů. To vše přispívá k potenciaci trombofilie (Greaves, 1999, Gomez-Puerta and Cervera, 2014, Kvasnička, 2003a).

1.3. Laboratorní vyšetření k vyloučení trombofilii

Důležitým aspektem v diagnostice trombofilii je indikace laboratorního vyšetření z hlediska pravděpodobnosti záchytu a praktického významu pro vyšetřovanou osobu. Vyšetření je indikováno selektivně, zejména u pacientů s rodinnou či osobní anamnézou tromboembolické nemoci, u pacientů s trombózou v nižším věku než 45 let, u pacientů s trombózou recidivující či v neobvyklé lokalizaci, u pacientů s kombinovanou trombotickou žilní a tepennou diatézou a u pacientek s opakovanou ztrátou plodu či jinými těhotenskými komplikacemi. Vyšetření lze v rámci pátrání po trombofilii fakultativně indikovat také u pacientů s jinými vybranými onemocněními asociovanými se zvýšeným rizikem trombózy, například malignitami, respiračními onemocněními, nefrotickým syndromem, paroxysmální noční hemoglobinurií, myeloproliferativními onemocněními, apod (Poul, 2006, Kvasnička, 2010, Hirmerová et al., 2014).

Laboratorní vyšetření k vyloučení trombofilií můžeme rozdělit na základní, která mohou být u výše uvedených indikací prováděna všemi zdravotnickými zařízeními a rozšířená fakultativní, především genetická, vyšetření, která mohou být indikována a prováděna již jen specializovanými trombotickými pracovišti (Kvasnička, 2010).

Vzhledem k tomu, že tromboembolická nemoc i aterotrombóza jsou multifaktoriální onemocnění, nelze rizika trombofilií hodnotit pouze na základě molekulárně genetických vyšetření, ale je nezbytné uplatnit relativně širokou škálu vyšetření. Mezi doporučená vyšetření k vyloučení trombofilií patří základní hematologické testy, tj. hemogram, diferenciální rozpočet leukocytů, velká koagulace (PT, APTT, fibrinogen, TT, aktivita antitrombinu III, D-dimery, etanol gelifikační test), krevní skupina v AB0 systému; dále speciální koagulační vyšetření k odhalení vrozených, respektive získaných dispozic (Pro C global test, protein C, protein S, respektive lupus antikoagulans, antikardiolipinové protilátky, anti-beta2 glykoprotein I); biochemická vyšetření (homocystein, celkový cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceridy, lipoprotein (a), CRP a další proteiny akutní fáze) a molekulárně genetická vyšetření, z nichž jsou v současné době v souvislosti s tromboembolickou nemocí zásadní pouze dvě, tj. mutace FV Leiden (1691>A) a mutace genu pro protrombin (20210G>A). Případná další molekulárně genetická vyšetření jiných polymorfizmů mohou být ve vybraných případech indikována pouze trombotickými centry (Kvasnička, 2010, Poul, 2006).

Z důvodu toho, že trombofilní stavy představují komplexní onemocnění, která mohou být zapříčiněna širokým spektrem poruch, zejména koagulace, krevních destiček a endotelu, tak i škála laboratorních metod, které mají potenciál v diagnostice trombofilií může být velká. Jedná se například o metody ke stanovení funkce krevních destiček (PFA) nebo agregometrická vyšetření v případě podezření na nedostatečnou protideštičkovou léčbu (kyselina acetylsalicylová, clopidogrel), ale také dosud často opomíjené vyšetření endotelu (například detekce sérových hladin solubilních adhezivních molekul – P-selektin, E-selektin, ICAM-1, VCAM-1), který s aktivitou krevních destiček úzce souvisí a v patofyziologii trombotických stavů hraje klíčovou roli (Kvasnička, 2003a).

1.4. Krevní destičky v patofyziologii trombotických stavů

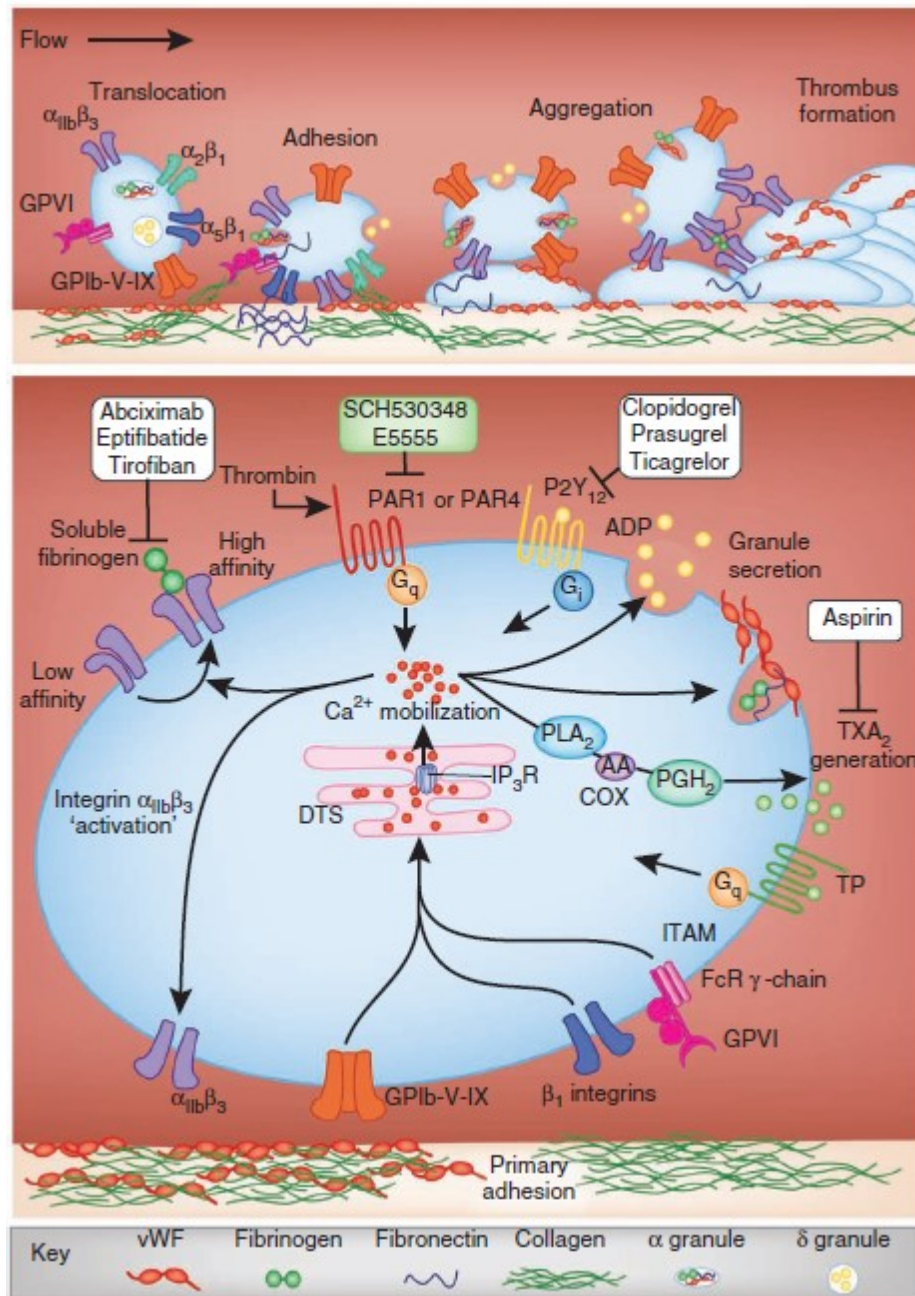
Fyziologicky má endotelová vrstva cévní stěny protitrombocytární vlastnosti. Za patofyziologických podmínek, tzn. při porušení cévní stěny, zánětlivých reakcích nebo

v místech zúženého průsvitu cévy však aktivovaný či odhalený endotel může zapříčinit adhezi krevních destiček, která představuje první krok v procesech hemostázy a trombózy (Gawaz et al., 1999). Za výše zmíněných patofyziologických podmínek dochází k expozici subendoteliálních proteinů, tj. von Willebrandova faktoru (vWF), fibrilárních kolagenů, fibronektinu a lamininu, které se váží ke specifickým receptorům krevních destiček. GP Ib/IX/V rozponává vWF, kolageny se váží na GP VI a GP Ia/IIa (integrin $\alpha 2\beta 1$), fibronektin na integrin $\alpha 5\beta 1$ a laminin na integrin $\alpha 6\beta 1$ (viz obrázek 1.1) (Jackson, 2011). Adheze krevních destiček je tedy zprostředkována těmito povrchovými glykoproteinovými komplexy, které jsou ve většině případů spřaženy s tzv. G-proteiny, které následně spouští intracelulární signalizační kaskádu vedoucí k aktivaci krevních destiček (Varga-Szabo et al., 2008). G-proteiny tedy ovlivňují funkci krevních destiček jako je aktivace iontových kanálů, enzymů a přestavba cytoskeletu, to vede ke změně tvaru a uvolnění alfa-granul, čímž dojde ke zvýšení exprese glykoproteinových receptorů, především GP IIb/IIIa a také P-selektinu na povrchu krevních destiček (Kvasnička, 2003a). V případě poranění cévní stěny nebo ruptury aterosklerotického plátu dochází k adhezi krevních destiček na odhalená kolagenová vlákna skrze glykoprotein GP VI, který zprostředkovává uvolnění sekundárních aktivačních agonistů adenosin difosfátu (ADP) a tromboxanu A_2 (TXA₂), a GP Ia/IIa, který je přímo spjat s intracelulární tyrozinovou kinázou a k aktivaci a přestavbě cytoskeletu krevní destičky tak dochází mnohem rychleji. V místě poranění cévy nebo ruptury nestabilního aterosklerotického plátu tak může dojít k aterotrombóze (Varga-Szabo et al., 2008, Ruggeri, 2002).

K aktivaci krevních destiček může docházet také z imunologických příčin, například vazbou protilátek namířených proti antigenům krevních destiček při rejekci štěpu po transplantaci, autoprotilátkami reagujícími s fosfolipidy krevních destiček a endotelu při antifosfolipidovém syndromu nebo protilátkami vytvořenými proti komplexu heparinu s destičkovým faktorem 4 (PF 4) při heparinem indukované trombocytopenii (Kvasnička, 2003a).

Během aktivace krevních destiček se také mění jejich tvar a vnitřní struktura, děje se tak změnou membránových fosfolipidů a přesunem fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu membrány, tím se krevní destičky stávají více trombogenní a mají vyšší afinitu k vazbě plazmatických koagulačních faktorů (F VII, F IX a F X). Navíc po aktivaci krevních destiček se do krevního oběhu uvolňuje část jejich hmoty, tzv. destičkové mikropartikule,

kteřé obsahují tkáňový faktor a další trombogenní molekuly a potencují tak trombofilii (Kvasnička, 2003a).



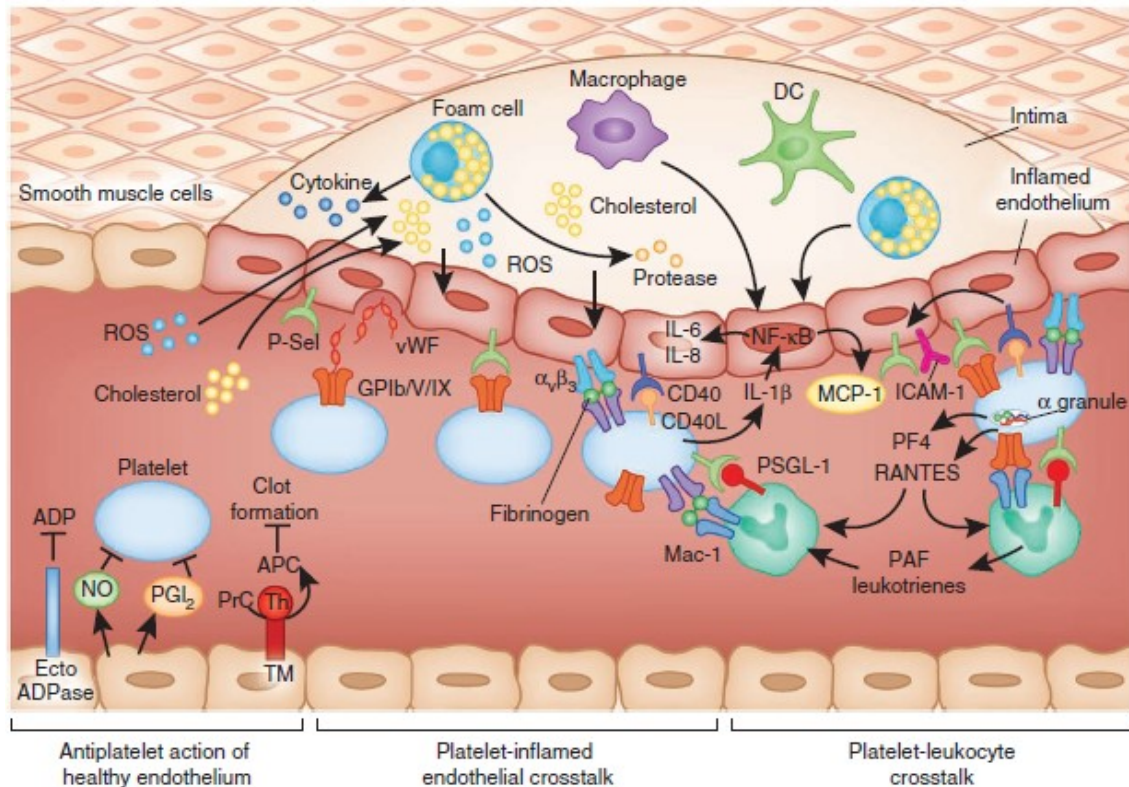
Obrázek 1.1. Mechanismus adheze a aktivace krevních destiček s vyznačenými glykoproteinovými receptory, jejich ligandy a signalizačními drahami. Zachycení krevních destiček v místě poranění cévní stěny prostřednictvím vazby GP Ib/IX/V s vWF, stabilizace adheze skrze vazbu GP VI na kolagenní vlákna. Aktivace GP IIb/IIIa vedoucí k interakci s adhezivním proteinem fibrinogenem, agregaci krevních destiček a růstu trombu. Uvolnění rozpustných agonistů (ADP, TXA₂, trombin) vedoucí přes aktivaci s G-proteiny spáženými receptory až k mobilizaci Ca²⁺ iontů (převzato z Jackson, 2011).

Dalším krokem po aktivaci a adhezi krevních destiček, který předchází vzniku primární destičkové zátky je agregace krevních destiček. Jak již bylo řečeno aktivace krevních destiček spouští signalizační kaskádu, která v konečném důsledku vede k uvolnění trombogenních molekul z denzních a alfa-granul krevních destiček, tj. například ATP, ADP, fibrinogenu, vWF, P-selektinu, GP IIb/IIIa, TXA₂ a také k mobilizaci vápenatých iontů (Ca²⁺), přičemž vazbou fibrinogenu na GP IIb/IIIa dalších krevních destiček dochází k jejich agregaci (viz obrázek 1.1). Tato aktivační a agregační řetězová reakce vede k tvorbě primárního destičkového trombu a zároveň k vazbě a aktivaci plazmatických koagulačních faktorů, přeměně protrombinu na trombin a nastartování celého koagulačního procesu (Kvasnička, 2003a).

1.5. Vztah endotelu a krevních destiček v patofyziologii trombotických stavů

Hlavní funkcí endotelu je regulovat průtok krve a v součinnosti s hladkým svalstvem a pericyty zajistit prokrvení tkání prostřednictvím změn v průměru a tlaku cév. Zároveň endotel v regulaci krevního toku slouží jako bariéra, která kontroluje pohyb tekutin, iontů a dalších makromolekul mezi cirkulující krví a okolními tkáněmi. Navíc skrze expresi adhezních molekul a cytokinů zajišťuje manifestaci a vazbu prozánětlivých leukocytů jako odpověď na poranění tkání a infekci. Endotelové buňky hrají klíčovou roli v hojícím procesu po poranění nebo zánětu, angiogenezi a regulaci aktivace krevních destiček a koagulační kaskády, čímž udržují krevní tok a brání tvorbě trombu. Neporušený endotel totiž uvolňuje ekto-ADPázu, trombomodulin, oxid dusnatý a prostaglandin I₂ (viz obrázek 1.2), čímž brání adhezi a agregaci krevních destiček (Yau et al., 2015, Jackson, 2011). Za patofyziologických podmínek, tzn. při porušení cévní stěny, zúžení cévní stěny (například okolo aterosklerotického plátu) nebo zánětu dochází k útlumu protitrombotické funkce endotelu. V hyperlipidemickém prostředí dochází k aktivaci endotelu v důsledku hromadících se molekul modifikovaného lipoproteinu (cholesterol) a reaktivního kyslíku (ROS). To vede k expresi adhezivních ligandů (vWF, P-selektin) na povrchu endotelu, jejichž exprese podporuje zachytávání a adhezi krevních destiček, které následně uvolňují cytokiny typu interleukinu-1 (IL-1), čímž se mění adhezivní vlastnosti endotelu (viz obrázek 1.2) (Jackson, 2011). K aktivaci endotelu prostřednictvím cytokinů IL-1 dochází také při zánětlivé reakci. Nejprve se z Weibel-Paladeho tělísek endotelu uvolňuje P-selektin. Po další expozici interleukinem-1 dochází

na povrchu endotelových buněk k expresi E-selektinu a adhezivních molekul imunoglobulinového typu 1 (ICAM-1), které jsou schopné vázat plazmatický fibrinogen a umožňují tak přichycení jak leukocytů, tak i aktivovaných krevních destiček.



Obrázek 1.2. Mechanismus aktivace endotelu v patofyziologických podmínkách vedoucí k adhezii a aktivaci krevních destiček a leukocytů při iniciační fázi vzniku aterosklerotického plátu s vyznačenými cytokiny, chemokiny a dalšími prozánětlivými působky (převzato z Jackson, 2011).

Aktivované adherované leukocyty po degranulaci uvolňují faktor aktivující krevní destičky (PAF), myeloperoxidázu a proteázy, které oslabují proteoglykanovou ochrannou vrstvu endotelu, což vede ke snížení protitrombotické funkce endotelu. Náchylnost k trombogenezi při zánětlivé reakci také roste se zvyšujícími se hladinami proteinů akutní fáze, tj. fibrinogenem, F VII, F VIII, inhibítozem fibrinolýzy PAI-1 a také vWF, který je uvolňován endotelovými buňkami a zprostředkovává vazbu s krevními destičkami skrze glykoproteinový komplex GP Ib/IX/V, který je exprimovaný na jejich povrchu (Kvasnička, 2003a). Naproti tomu při poškození cévní stěny dochází k okamžité fúzi Weibel-Paladeho tělísek s plazmatickou membránou endotelových buněk a k uvolnění adhezivních molekul a receptorů (vWF, t-PA, P-selektin atd.) na povrch endotelových

buněk, kde potencují adhezi krevních destiček v místě poranění. Interakce mezi endotelem a krevními destičkami tak má zásadní roli v aktivaci a regulaci krevních destiček (Yau et al., 2015).

1.6. Endotelové buňky v krevní cirkulaci

Endotelové buňky patří do nehematopoetické linie buněk, které mohou být detekovány v periferní krvi, i když za fyziologických podmínek ve velmi nízkých počtech, tj. méně než 50 buněk v 1 ml periferní krve zdravého jedince (Lanuti et al., 2016). Jak již bylo zmíněno, povrch cévní stěny tvořený adhezaními endotelovými buňkami se tedy fyziologicky udržuje ve stavu protitrombotickém a protizánětlivém, nicméně různými patologickými stimuly, jako jsou například cytokiny, růstové faktory nebo infekční působy, mohou být endotelové buňky aktivovány, čímž může dojít k narušení vrstvy endotelových buněk a ty mohou podléhat apoptóze nebo být uvolněny do krevní cirkulace. Takové buňky nazýváme zralými cirkulujícími endotelovými buňkami (CEC) (Erdbruegger et al., 2006a). Druhou buněčnou populací endoteliální linie detekovatelnou v periferní krvi jsou nezralé endotelové progenitorové buňky (EPC), které na rozdíl od CEC nejsou oddělené z cévní stěny, ale jejich původ je v kostní dřeni. EPC se od CEC liší nejenom původem, ale i dalšími vlastnostmi, například schopností tvořit kolonie *in vitro* a dokonce se mohou do zralých endotelových buněk i diferenciovat (Boos et al., 2006). Rozdílný původ a diferenciaci, tzn. různá stadia zralosti buněk, mají vliv nejen na identifikaci a detekci těchto buněk, která bude podrobně probrána dále, ale i na chápání jejich potenciálního patofyziologického významu, přičemž CEC jsou považovány spíše za markery cévního poškození, zatímco EPC za markery jeho obnovy (Boos et al., 2006, Erdbruegger et al., 2006a).

1.6.1. Cirkulující endotelové buňky

Cirkulující endotelové buňky (CEC) byly nejprve detekovány v 70. letech 20. století mikroskopickými technikami na zvířecích modelech, které při vystavení například šokovou dávkou ovalbuminu vykazovaly zvýšené počty CEC (Wright and Giacometti, 1972). Poté již následovaly první práce na lidech, které ukazovaly změny počtů CEC při kouření, hypertenzi, akutním infarktu myokardu, v rámci léčby imunosupresí a inhibitory

prostaglandinu E nebo při homocysteinémii po zátěži methioninem (Prerovský and Hladovec, 1979, Hladovec et al., 1976, Hladovec et al., 1978, Sinzinger et al., 1988, Hladovec and Prerovský, 1989, Hladovec et al., 1997).

V současné době je známo, že integrita endotelové vrstvy je narušena v důsledku působení mnoha faktorů, jako jsou cytokiny, proteázy apod, nebo jednoduše mechanickým poškozením, což vede k uvolnění endotelových buněk do cirkulace. Není ale jednoznačné, zdali je toto oddělení endotelových buněk příčinou nebo následkem apoptózy (Erdruegger et al., 2006a). Hlavní úlohu v udržení celistvosti endotelové vrstvy mají endotelové adhezivní molekuly spadající do rodiny integrinů a kadherinů, tj. vitronektin, fibronektin a VE kadherin (Woywodt et al., 2002). Tyto proteiny urychlují tvorbu cytoskeletárních proteinů a zprostředkovávají signální mechanismy pro přežití buněk. V případě narušení těchto signálů dochází k oddělení a apoptóze endotelových buněk (Oguey et al., 2000). K uvolnění endotelových buněk do cirkulace přispívají například granulocytární proteázy (Boehme et al., 2002) nebo cytokiny jako je TNF nebo interferon γ , které potlačí signalizační funkce integrinů (Rüegg et al., 2002). V neposlední řadě mají na oddělení endotelových buněk vliv mechanické síly, což bylo ukázáno u pacientů s perkutánní koronární intervencí (Mutin et al., 1999). Na druhou stranu byly popsány i faktory, které brání apoptóze endotelových buněk. Jedná se například o vaskulární endotelový faktor (VEGF) nebo oxid dusnatý (NO), které inhibují apoptózu endotelových buněk (Dimmeler et al., 1997, Grosjean et al., 2006). Z výše uvedeného vyvstaly otázky, jestli jsou uvolněné endotelové buňky vůbec viabilní a také otázky o původu CEC. V tomto ohledu jsou publikované práce částečně kontroverzní, k čemuž přispívá i nízký počet CEC v cirkulaci, a tudíž jejich obtížná identifikace a kultivace. Například hlavně jako nekrotické a nekultivovatelné se jeví CEC u pacientů s vaskulitidou malých cév spojenou s anti-neutrofilními cytoplazmatickými protilátkami (ANCA) (Woywodt et al., 2003). Naproti tomu jiná práce popisuje CEC jako viabilní, i když s omezenou schopností růstu (Lin et al., 2000). I v otázce původu nepanuje jasná shoda. Zatímco zvýšená exprese znaku CD36 na CEC u pacientů se srpkovitou anémií, talasémií nebo některými malignitami naznačuje jejich mikrovaskulární původ (Solovey et al., 1997, Mancuso et al., 2001, Butthep et al., 2002), tak CD36 negativita u pacientů s akutním koronárním syndromem nebo systémovým lupus erythematoses odkazuje na původ makrovaskulární (Mutin et al., 1999, Blann et al., 2005).

Vztah mezi zvýšenými počty CEC a rozpustnými plazmatickými markery, jako jsou vWF, aktivátor tkáňového plazminogenu (TPa), trombomodulin, tkáňový faktor (TF) či E-selektin by mohl poukazovat na stupeň poškození, dysfunkce nebo aktivace endotelu (Blann et al., 2005). Na základě publikovaných dat byla prokázána dobrá korelace mezi počtem CEC s vWF, TF a částečně i E-selektinem (Kas-Deelen et al., 2000, Makin et al., 2004, Rajagopalan et al., 2004). Zvýšené hladiny CEC byly detekovány u mnoha nemocí souvisejících zejména s kardiovaskulárním systémem, například akutním infarktem myokardu (Mutin et al., 1999), akutní ischemickou cévní mozkovou příhodou (Nadar et al., 2005), stabilní anginou pectoris po koronární angioplastice (Bonello et al., 2006), chronickou žilní insuficiencí (Janssens et al., 1999), onemocněním periferních tepen (Makin et al., 2004) nebo akutním a chronickým selháním srdce (Chong et al., 2006) či plicní arteriální hypertenzí (Bull et al., 2003), u kterých byla navíc prokázána i souvislost se zvýšeným vWF (Preston et al., 2002).

Zvýšené počty CEC byly očekávány v po transplantačních podmínkách, především při rejekci štěpu, například kvůli možnému poškození cévní stěny v důsledku již existující aterosklerózy, která byla pozorována po transplantaci ledvin (Popa et al., 2002) nebo u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk s konvenčním přípravným režimem (Woywodt et al., 2004b). Hladiny CEC by tak mohly poukazovat na stav poškození endotelu před transplantacemi a ovlivnit tak dávky v přípravném režimu (Woywodt et al., 2004a).

Nárůst počtu CEC byl pozorován také u infekčních onemocnění, např. rickettsiové infekce (George et al., 1993), infekce cytomegaloviru (Percivalle et al., 1993) a septického šoku (Mutunga et al., 2001), dále u autoimunitních onemocnění, tj. systémovém lupus erythematoses (Clancy et al., 2001), vaskulitidě (Woywodt et al., 2003) a Kawasakiho syndromu (Nakatani et al., 2003). U pacientů s lymfomy a pacientek s karcinomy prsu byl prokázán pěti násobný nárůst počtu CEC oproti zdravým kontrolám, který navíc významně koreloval s plazmatickými proteiny VCAM-1 a VEGF (Mancuso et al., 2001). Mimo jiné byla také zjištěna korelace zvýšené hladiny CEC s progresí onemocnění u onkologických pacientů (Beerepoot et al., 2004).

V neposlední řadě také u hematologických onemocnění, které jsou asociované s poruchou endotelové buněčné vrstvy, byly prokázány zvýšené hladiny CEC. Například se jednalo o pacienty se srpkovitou anémií ve fázi s akutními bolestmi (Solovey et al., 1997),

pacientů s různými druhy talasemií, u kterých navíc byla dobrá korelace mezi počtem CEC a hladinami plazmatických proteinů VEGF a TNF- α (Butthep et al., 2002) nebo u pacientů s trombotickými mikroangiopatiemi, např. trombotickou trombocytopenickou purpurou (Lefevre et al., 1993), u kterých po úspěšné léčbě plazmaferézami došlo k poklesu počtu CEC (Erdbuegger et al., 2006b). A konečně zvýšené počty CEC byly pozorovány i u pacientů s akutní i chronickou fází hluboké žilní trombózy, přičemž ke snížení došlo po devíti až patnácti měsících od akutní události (Alessio et al., 2013).

1.6.2. Endotelové progenitorové buňky

V roce 1997 byly poprvé izolovány a charakterizovány buňky, které byly považovány za endotelové progenitorové buňky (EPC) (Asahara et al., 1997). Tím došlo k obrovskému zájmu o tuto oblast výzkumu, protože EPC sledované ve vztahu k endoteliální dysfunkci, která je považovaná za ukazatel budoucí aterosklerózy, mají potenciální schopnost čelit poškození endotelu, tzn. potenciál v léčbě aterosklerózy a využití EPC jako biomarkeru spolu s klasickými kardiovaskulárními rizikovými faktory (Van Craenenbroeck et al., 2013). Tato domněnka byla následně potvrzena zásadní studií zabývající se prognostickým významem EPC u kardiovaskulárních onemocnění. Bylo prokázáno, že pacienti s ischemickou chorobou srdeční, u kterých byla detekována vysoká hladina cirkulujících EPC vykazovali snížené riziko úmrtí z kardiovaskulárních příčin po jednom roce sledování (Werner et al., 2005). Tato studie potvrdila a rozšířila dřívější zjištění, že hladiny EPC jsou dobrým biologickým markerem funkce cévního systému a markerem rizika kardiovaskulárních onemocnění (Hill et al., 2003).

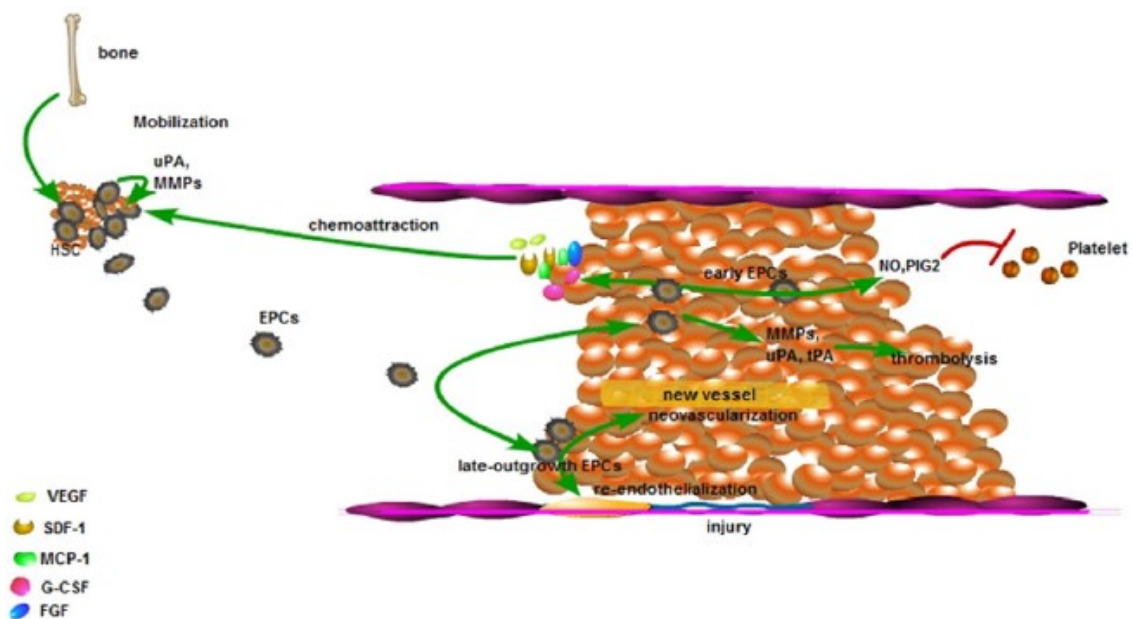
Hemangioblasty jsou považovány za společné prekurzory různých buněčných linií, a to jak hematopoetických kmenových buněk (HSC), tak i EPC, které jsou vlastnostmi podobné kmenovým buňkám, neboť mají schopnost sebeobnovy, klonogenicity a diferenciace. Proto mohou být EPC izolované z různých tkání, přičemž jejich imunofenotypový charakter je podobný. Na základě původu lze EPC rozdělit na tři hlavní větve; (1) hematopoetické EPC, které mohou být izolovány především z kostní dřeně a nazývané jsou jako z kostní dřeně odvozené endotelové buňky (BMEC), (2) tkáňově rezidentní EPC, které mohou být izolované z různých tkání, například srdeční, tukové či nervové nebo také z pupeční šňůry a (3) nehematopoetické EPC, které mohou být izolovány z periferní nebo pupečnickové krve a o kterých především bude pojednáno dále.

Obecně lze tedy říct, že existují buď „domácí“ EPC umístěné v kostní dřeni a periferní či pupečnickové krvi anebo EPC vyrobené transdiferenciací z různých tkání v podmínkách mikroprostředí vhodných pro endoteliální diferenciaci. Obě tyto skupiny EPC se účastní neovaskularizačního mechanismu (diferenciace, proliferace, migrace a začlenění) tvorby cév, nicméně proliferační aktivita u „domácích“ EPC je významně vyšší (Chopra et al., 2018).

Po objevení a první izolaci EPC z periferní krve následovaly snahy o zjištění jejich pravé povahy (Van Craenenbroeck et al., 2013). Původně byly EPC izolovány jako buňky diferenciované z CD34+ obohacených mononukleárních buněk periferní krve, které se úspěšně účastnily vaskulogeneze na zvířecím modelu, nicméně jejich proliferační potenciál byl nízký a buňky umíraly po čtyřech až šesti týdnech (Asahara et al., 1997). Poté se jiné skupině podařilo prokázat existenci jiných cirkulujících EPC, jejichž původ je v kostní dřeni. Tyto EPC generovaly vysoce proliferující buňky po dvou až čtyřech týdnech kultivace, které vytvářely monovrstvu buněk s endoteliálním fenotypem (Lin et al., 2000). Existence těchto dvou typů EPC byla potvrzena kultivací mononukleárů periferní krve v médiu pro endotelové buňky, kde se postupně objevily dva typy EPC, které byly nazvány jako brzké, respektive pozdní EPC (eEPC, respektive lEPC). Zároveň bylo zjištěno, že eEPC představují heterogenní buněčnou populaci, která zahrnuje několik klonů generujících lEPC (Hur et al., 2004). Následně proběhly další studie, které se zabývaly původem, fenotypem a angiogenními vlastnostmi EPC, což přispělo ke změně nomenklatury. Alternativně jsou eEPC nazývány spíše jako cirkulující angiogenní buňky (CAC) (Rehman et al., 2004) a lEPC jako rostoucí endotelové buňky (OEC) (Lin et al., 2000) nebo buňky vytvářející endotelové kolonie (ECFC) (Ingram et al., 2004). Dohromady jsou tyto buňky označovány jako cirkulující endoteliální progenitory (CEP) (Chopra et al., 2018). U prvního typu buněk (eEPC), které se objeví v kultivačním médiu po 4-7 dnech bylo zjištěno, že se sice nediferencují do endotelových buněk ani se nezačleňují do endoteliální sítě, přesto však významně indukují tvorbu endotelové vrstvy *in vitro* a mají vliv na opravu cév *in vivo* (Hur et al., 2004). Naproti tomu druhý typ buněk (lEPC), který se v kultivačním médiu objeví po 6-21 dnech přímo spontánně tvoří krevní cévy *in vivo* (Lin et al., 2000). Tyto buňky generované z CD34+CD45-, tedy nehematopoetické, frakce jsou označovány jako tzv. „pravé“ EPC a mohou být detekovány metodou průtokové cytometrie (Timmermans et al., 2007), která bude podrobně probrána v následující kapitole.

Potenciál cirkulujících EPC v regulaci funkce endotelu je obrovský, protože jejich hladiny jsou ovlivněny exogenními i endogenními faktory, ale i různými patologickými podmínkami. EPC jsou tak přímými indikátory funkce endotelu (Chopra et al., 2018). Mezi hlavní exogenní faktory ovlivňující počty EPC je cvičení, které je důležité pro udržení normálních fyziologických funkcí. Zvýšené počty EPC byly pozorovány u profesionálních běžců (Bittencourt et al., 2017). Dokonce bylo zjištěno, že pouhých 10 minut cvičení zvyšuje hladinu EPC čtyřikrát (Rehman et al., 2004). Naopak hlavním negativním exogenním faktorem působícím na hladiny EPC je kouření, u kterého sice krátkodobá nízká dávka nikotinu zvyšuje počty cirkulujících EPC (Wang et al., 2004), naproti tomu chroničtí kuřáci mají počty EPC významně redukovány, k jejichž rychlé regeneraci však opět může dojít po vyléčení kuřácké závislosti (Kondo et al., 2004). Dále se na počtech EPC negativně mohou podepisovat psychické faktory, jako jsou například deprese (Dome et al., 2009). Důležitým endogenním faktorem ovlivňujícím hladiny EPC se zdá být pro lipidový metabolismus významný oxidovaný LDL cholesterol, který inhibuje VEGF indukovanou diferenciaci EPC a může tak mít nepřímý vliv na rozvoj aterosklerózy spojenou s hypercholesterolémií (Imanishi et al., 2003). V neposlední řadě změny v hladinách EPC byly popsány u mnoha patologických stavů a onemocnění. Porucha funkce EPC byla například prokázána u pacientů s výrazně zvýšenou hypertenzí, která může souviset s následným rozvojem kardiovaskulárních příhod (MacEaney et al., 2011). Snížené počty EPC byly pozorovány u pacientů s diabetem mellitu oproti zdravým jedincům, jejich EPC navíc vykazovaly sníženou proliferaci, adhezi, migraci a inkorporaci do cévní struktury (Tepper et al., 2002). Na základě četných studií bylo navrženo, že dysfunkce endotelu je těsně spjatá s kardiovaskulárními nemocemi, zvýšené počty EPC byly detekovány například u pacientů s akutním infarktem myokardu (Massa et al., 2005) nebo u pacientů s nestabilní anginou pectoris, kde byla zároveň prokázána pozitivní korelace s hladinou CRP (George et al., 2004). Dobrý prognostický potenciál mají EPC u cerebrovaskulárních onemocnění. K náhlému zvýšení počtu EPC došlo u pacientů v akutní fázi ischemické cévní mozkové příhody oproti rizikové kontrolní skupině. Navíc významně nižší hodnoty EPC byly detekovány u pacientů se závažným neurologickým poškozením. Nízké hladiny EPC tak mohou být považovány za prediktivní faktor závažných neurologických komplikací, zatímco zvýšené hladiny EPC jsou asociovány s neurologickým zlepšením (Yip et al., 2008). Snížené počty EPC byly také prokázány u pacientů s vaskulogenní erektilní dysfunkcí bez známých faktorů kardiovaskulárních rizik (Foresta et al., 2005). Vzhledem k důležité roli vaskularizace u

progrese a růstu nádorů se předmětem studia v souvislosti s funkcí EPC jako biomarkeru stala i nádorová onemocnění. Zvýšené počty EPC byly prokázány u mnohočetného myelomu (Zhang et al., 2005), akutní myeloidní leukémie (Zahran et al., 2016), hepatocelulárního karcinomu (Ho et al., 2006), karcinomu prsu (Rhone et al., 2017) nebo karcinomu ledvin (Yu et al., 2014). Změny v počtu EPC byly také pozorovány u pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním s trombotickými komplikacemi, přičemž bylo očekáváno, že snížené počty EPC by mohly mít vliv na zvýšené riziko rozvoje trombózy (Teofili et al., 2011). To potvrzuje jiná práce, podle které EPC vazbou na krevní destičky a prostřednictvím zvýšené produkce cyklooxygenázy-2 a prostacyklinu regulují funkci krevních destiček a tvorbu trombu (Abou-Saleh et al., 2009). Naproti tomu bylo navrženo, že aktivované krevní destičky prostřednictvím jejich interakce s EPC ovlivňují jejich navádění do míst poškození cévní stěny a dovnitř trombu (Lev et al., 2006), kde se EPC následně uplatňují v procesu neovaskularizace a mohou se tak podílet na odstranění trombu (viz obrázek 1.3) (Li and Li, 2016).



Obrázek 1.3. Mechanismus možného uplatnění EPC při neovaskularizaci endotelové vrstvy cévní stěny a odstraňování trombu (převzato z Li and Li, 2016).

1.7. Stanovení endotelových buněk od mikroskopie k průtokové cytometrii

První laboratorní techniky, kterými byly v 70. letech 20. století identifikovány CEC byly založené na principu světelné mikroskopie, barvení Giemsou a separaci pomocí hustotní gradientové centrifugace (Bouvier, 1970, Hladovec and Rossmann, 1973). Vzhledem k velmi nízkému počtu endotelových buněk v cirkulaci a dnešním metodologickým standardům musíme ale tyto techniky považovat za poměrně málo citlivé, přičemž během přípravy nátěrů mohlo dojít k značným buněčným ztrátám (Erdbuegger et al., 2006a). Pokročilejší technikou byla metoda nepřímé imunofluorescence, která využívala protilátky proti endotelovým markerům, jako je například vWF (Percivalle et al., 1993). Bohužel škála těchto protilátek byla úzká, navíc protilátky byly často namířené proti málo specifickým antigenům (adhezní molekuly, integriny) nebo proti intracelulárním antigenům (TPa, vWF), které zase nedisponovaly monoklonálními formami. Navíc tyto techniky stále závisely na kvalitě nátěrů (Erdbuegger et al., 2006a).

Na počátku 90. let 20. století bylo k dispozici již více specifických protilátek namířených proti povrchovým markerům endotelových buněk, např. HEC-19 a S-Endo 1, které byly použité ke kvantifikaci CEC v periferní krvi (Sbarbati et al., 1991, George et al., 1992). Následně byla identifikována a potvrzena nová pan-endoteliální protilátka rozpoznávající molekulu CD146 (Solovey et al., 1997, Bardin et al., 1996), která byla posléze použita ke kvantifikaci CEC v různých podmínkách a nemocech s využitím nových více standardizovaných technik, tj. imunomagnetická izolace a tzv. fluorescenčně aktivované třídění buněk (FACS) prováděné metodou průtokové cytometrie.

První zmíněná technika imunomagnetické izolace byla určena právě pro identifikaci vzácných buněčných populací z periferní krve (například metastatických tumorových buněk) a proto byla vhodná i pro detekci CEC. Principem metody je izolovat endotelové buňky z periferní krve pomocí paramagnetických kuliček (Dynabeads) potažených anti-CD146 protilátkou, cílové buňky jsou zachyceny pomocí magnetu a vizualizovány fluorescenčním barvivem (akridin) (George et al., 1992). Ve své době byla tato technika nejvíce používanou metodou pro izolaci endotelových buněk z periferní krve (Erdbuegger et al., 2006a). To se ale změnilo s objevením a první izolací EPC (Asahara et al., 1997). Jak již bylo řečeno CEC představují zralou a EPC nezralou buněčnou populaci patřící do endoteliální linie. Protože obě tyto populace buněk exprimují na svém

povrchu pan-endoteliální marker CD146, nelze je metodou imunomagnetické izolace jednoznačně odlišit (Erdruegger et al., 2006a). V současné době nejvhodnější metodou pro identifikaci CEC se tak zdá být metoda průtokové cytometrie, která umožňuje stanovení kompletního imunofenotypu cílové populace buněk. Pro studium a kvantifikaci EPC se používají především dvě metody, jednak průtoková cytometrie a vzhledem k jejich schopnosti tvořit kolonie *in vitro* také kultivační techniky (Van Craenenbroeck et al., 2013).

Průtoková cytometrie je v současné době považována za jednu z nejpřínosnějších metodik v hematologii. Uplatnění průtokové cytometrie spočívá zejména v nádorové hematologii při diagnostice hematologických malignit, nicméně její aplikace vzrůstá i v nenádorové hematologii. Jedním z jejích přístupů je tzv. imunofenotypizace, při které je detekována povrchová, cytoplazmatická či jaderná exprese buněčných antigenů pomocí monoklonálních nebo polyklonálních protilátek. Vzhledem k vysokému počtu identifikovaných antigenů byla v roce 1982 zavedena CD (z angl. Cluster of differentiation) nomenklatura (Marinov, 2008). V posledních letech je hojně využívaná tzv. vícebarevná průtoková cytometrie, která umožňuje hodnocení většího počtu znaků (standardně již 8 znaků) v jedné zkumavce. Tato metodika, která umožňuje hodnocení obrovského počtu (milióny) buněk v suspenzi, se zdá být proto nejvhodnější pro identifikaci, charakterizaci, diferenciaci a kvantifikaci CEC a EPC v periferní krvi. Nicméně z důvodu velmi nízkého počtu (<50 buněk/ml) endotelových buněk v cirkulaci, a ne zcela konzistentní shodě na jejich imunofenotypovém charakteru nebyla dosud přijata jednoznačná doporučení pro hodnocení endotelových buněk touto metodikou (Lanuti et al., 2016).

Stanovení CEC a EPC by mělo být provedeno na základě exprese specifických povrchových markerů, avšak imunofenotyp použitý pro jejich identifikaci a interpretaci naměřených dat se na základě publikovaných prací značně lišil. Například první izolace EPC proběhla na základě pozitivní koexpresie znaků CD34 a KDR (neboli VEGFR-2) (Asahara et al., 1997). Ovšem antigen CD34 není specifický a je exprimovaný i buňkami CEC, proto pro odlišení zralých a nezralých endotelových buněk byl navržen třetí antigen, CD133, tedy marker nezralých kmenových buněk (Peichev et al., 2000). Další nejasnosti panovaly nad expresí pan-leukocytárního znaku CD45, který byl většinou považován za pozitivní. Přestože u endoteliální linie byla na úrovni mRNA prokázána negativita CD45 antigenu (Case et al., 2007). Z těchto důvodů se objevily i názory, že tzv. IEPC nejsou

odvozené od CD45+ prekurzorových buněk (Timmermans et al., 2007). S rozvojem citlivosti metody vícebarevné průtokové cytometrie se také dospělo k lepšímu chápání exprese znaku CD45 na endotelových buňkách v cirkulaci, přičemž bylo dosaženo lepšího rozlišení mezi slabou, silnou nebo normální expresí znaku CD45. Dle dalších studií bylo tedy navrženo, že CD34+KDR+ buňky, které byly považované za EPC, exprimují znak CD45 slabě (Estes et al., 2010, Schmidt-Lucke et al., 2010), což bylo i následně kriticky potvrzeno jako nejlepší kompromis z pohledu citlivosti, specifčnosti a spolehlivosti přístupu ke kvantifikaci EPC (Fadini et al., 2012).

Dalším významným markerem v identifikaci endotelových buněk je, jak již bylo zmíněno dříve, znak CD146. Antigen CD146 je exprimován nejen na endotelových buňkách, ale i na například aktivovaných T lymfocytech, ty mohou být odlišeny pomocí T lymfocytárního znaku CD3, dále mohou být do panelu přidány reagentie na průkaz viability (např. propidium jodid nebo 7-AAD), případně markery aktivace endotelu (např. CD62e nebo CD106) nebo prokoagulační markery (např. tkáňový faktor) (Erdbuegger et al., 2006a). Pro identifikaci endoteliální linie jsou napříč jednotlivými studii používány různé další antigeny, nejčastěji to jsou tedy již zmíněné CD146 (MCAM, S-Endo, PIH2) a KDR (VEGFR-2), dále také CD31 (PECAM-1), CD54 (ICAM-1) nebo CD144 (VE kadherin) (Blann et al., 2005). Proto se v charakterizaci endotelových buněk dobře uplatňuje právě metoda vícebarevné průtokové cytometrie umožňující hodnocení širokého panelu antigenů (Erdbuegger et al., 2006a).

Na základě publikovaných prací existuje celá řada panelů použitých pro stanovení endotelových buněk, někteří autoři identifikují EPC na základě imunofenotypu jako CD45 slabě pozitivní nebo negativní, CD34 pozitivní, CD31 pozitivní a CD133 pozitivní populaci a CEC jako CD45 slabě pozitivní nebo negativní, CD34 pozitivní, CD31 pozitivní a CD133 negativní populaci (Duda et al., 2007, Steurer et al., 2008, Obeid et al., 2015). Avšak antigeny CD133 a CD34 jsou exprimovány různými buněčnými populacemi včetně hematopoetických kmenových buněk (Wognum et al., 2003) a zároveň antigen CD31 není specifickým markerem endoteliálních buněk (Peichev et al., 2000), proto tyto markery nemohou být samostatně použity pro identifikaci EPC a CEC (Mitchell et al., 2017). Z těchto důvodů došlo u dalších studií k rozšíření imunofenotypového panelu o markery více specifické pro endoteliální buněčnou linii, jako jsou již výše zmíněné antigeny CD146, CD144 nebo KDR (Mancuso et al., 2009,

Mobius-Winkler et al., 2009, Kraan et al., 2012, Alessio et al., 2013, Lanuti et al., 2016, Doyle et al., 2017, Huizer et al., 2017).

Z důvodu rozmanitosti studovaných nemocí a různých metodik použitých pro identifikaci endotelových buněk byla zjištěna velká variabilita v prokázaných hladinách CEC, která se v patofyziologických stavech pohybovala v rozmezí 1 až 39100 buněk v 1 ml periferní krve, což lze připsat rozdílnosti v charakteru zkoumaných nemocí. Avšak velké rozdíly jsou patrné i v hodnotách naměřených u zdravých kontrol, ty se pohybují v rozmezí od 0 do 7900 buněk v 1 ml periferní krve (Blann et al., 2005). To pravděpodobně pramení z použití rozdílných protokolů (Erdbuegger et al., 2006a), kde v jedné studii bylo například vypočteno, že průměrný počet CEC u zdravých kontrol činí 77 buněk v 1 ml periferní krve (Del Papa et al., 2004), zatímco v jiné studii to představuje 7900 buněk v 1 ml periferní krve (Mancuso et al., 2001).

Základním problémem při identifikaci endotelových buněk pomocí průtokové cytometrie je jejich nízký počet v cirkulaci. Při analýze tzv. vzácných populací se musí cytometrista vypořádat s redukcí šumu a zesílením signálu, aby se eliminovaly falešně pozitivní signály (Khan et al., 2005). Proto pro spolehlivou a reprodukovatelnou cytometrickou analýzu není kritický pouze správně sestavený imunofenotypový panel, ale také preanalytická a analytická fáze přípravy vzorku, a nakonec samozřejmě také správná analýza a interpretace naměřených dat (Khan et al., 2005, Van Craenenbroeck et al., 2013).

Preanalytická fáze začíná odběrem výchozího materiálu, v tomto případě periferní krve, pacientům nebo kontrolní skupině. Na hladinu endotelových buněk v cirkulaci má vliv i krátkodobé cvičení (Rehman et al., 2004) a kouření (Kondo et al., 2004), proto by se odebírané osoby měly před odběrem krve zdržet kouření a být v klidu (Van Craenenbroeck et al., 2013). Odběr krve se provádí do zkumavek s antikoagulačním činidlem (EDTA, heparin, ACD), přičemž první zkumavka by neměla být k analýze použita, aby se zabránilo kontaminaci endotelovými buňkami uvolněnými při vpichu jehlou (Goon et al., 2005). Bylo zjištěno, že počet EPC významně klesl po 24 hodinovém skladování vzorků (Masouleh et al., 2010). Dobu skladování vzorků lze prodloužit použitím stabilizačního činidla (Transfix), které udrží spolehlivost analýzy CD34+ buněk po dobu 7 dnů (Hoymans et al., 2012). Velmi důležitým faktorem preanalytické fáze je volba počátečního materiálu, ze kterého budou cílové buňky izolovány, nejčastěji to je

přímo plná krev nebo mononukleární buňky periferní krve připravené hustotní gradientovou centrifugací, přičemž byly zjištěny poměrně velké diskrepance srovnáním konečného počtu EPC získaných těmito postupy (Van Craenenbroeck et al., 2008). Dalším faktorem, který ovlivňuje analýzu je manipulační teplota, jsou prokázány zvýšené fluorescenční intenzity u vzorků skladovaných při pokojové teplotě už po 6 hodinách oproti vzorkům skladovaným při 4 °C po 24 hodinách (Jamsa et al., 2011).

Analytická fáze zahrnuje správné nastavení průtokového cytometru a denní kontrolu jeho stability pomocí komerčních standardizovaných kuliček, volbu vhodného protokolu přípravy vzorku (např. značení protilátkami / lýza erytrocytů / promytí) a načtení dostatečného množství událostí (1-2 miliony), což je důležité zejména při analýze tzv. vzácných populací, jako jsou i CEC a EPC (Van Craenenbroeck et al., 2013). Zároveň je však nezbytné být na pozoru před falešně pozitivními událostmi způsobenými zvýšeným šumem pozadí, autofluorescencí nebo nespecifickou vazbou protilátek (Van Craenenbroeck et al., 2008), ty mohou být eliminovány použitím silných fluorochromů u slabých antigenů, preinkubací s blokovacími séry, použitím viabilního barvení, řádným promýváním přístroje nebo odstraněním nesprávně navázaných protilátek (doubletů) (Khan et al., 2005, Fadini et al., 2008).

Od objevení a první izolace EPC (Asahara et al., 1997) došlo nejen k rozvoji samotné metodiky vícebarevné průtokové cytometrie (např. digitální výpočet kompenzační matice), ale také k vývoji pokročilé analýzy naměřených dat, a to například v aplikaci tzv. FMO (fluorescence-minus-one) kontrol, které slouží k nastavení hranic positivity pro jednotlivé fluorescenční kanály bez nutnosti použití izotypových kontrol (Tung et al., 2004) nebo biexponenciálnímu zobrazení naměřených dat, což vedlo ke zvýšení přesnosti kvantifikace endotelových buněk a identifikaci jednotlivých subpopulací (Estes et al., 2010). Tyto nové výše uvedené analytické techniky, včetně gatovací strategie, vyjádření výsledků a statistického zpracování, jsou použité v několika stěžejních protokolech, které se zabývají identifikací endotelových buněk v cirkulaci (Khan et al., 2005, Estes et al., 2010, Masouleh et al., 2010, Schmidt-Lucke et al., 2010). Bohužel dle srovnání těchto protokolů mezi nimi existují, i přes jisté podobnosti, relativně zásadní rozdíly a diskrepance, například v kultivačním potenciálu EPC, v expresi antigenu CD45 nebo ve spolehlivosti antigenu KDR jako liniově specifického markeru (Mund and Case, 2011).

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1. Vědecká hypotéza

Změny v počtech cirkulujících endotelových buněk (CEC, markery poškození endotelu) a endotelových progenitorových buněk (EPC, markery obnovy endotelu) kvantifikované pomocí standardizované metody vícebarevné průtokové cytometrie z periferní krve odráží aktivitu endotelu a krevních destiček v patofyziologických mechanismech trombotických stavů u pacientů se známou trombofilií a přispívají tak k včasnému odhalení vzniku či rekurence trombózy.

Konkrétně zvýšené hladiny CEC poukazují na akutní či chronickou fázi trombózy, přičemž po vyléčení se CEC opět normalizují, tzn. že sledování hladin CEC může mít potenciál v monitoringu léčby trombózy. U pacientů se známou trombofilií s nebo bez historie trombózy zase zvýšené počty CEC, společně s dalšími testy na vyloučení trombofilií, indikují vyšší riziko vzniku nebo rekurence trombózy.

Naproti tomu EPC především regulují funkci krevních destiček, cestují do míst poškození cévní stěny, zapojují se v procesu neovaskularizace a snižují tak riziko vzniku nebo rekurence trombózy.

V každém případě pouze standardizované cytometrické stanovení CEC a EPC, společně s dalšími hematologickými, biochemickými a molekulárně genetickými testy v rámci diagnostiky trombofilií, umožní včasné odhalení zvýšeného rizika vzniku nebo rekurence trombózy, přispěje k zahájení indikace profylaktické léčby nebo případně i zprostředkuje sledování následné trombolytické léčby tohoto závažného onemocnění.

2.2. Cíle práce

Prostřednictvím optimalizované a standardizované metody vícebarevné průtokové cytometrie ze vzorků periferní krve:

- ověřit správnost sestavené metodiky na kontrolním souboru pacientů s očekávanými zvýšenými počty CEC a EPC,
- stanovit referenční počty CEC a EPC na souboru zdravých kontrol,
- kvantifikovat CEC a EPC u pacientů s prokázanou trombofilií s nebo bez historie dřívější trombózy,

- kvantifikovat CEC a EPC u pacientů s akutní trombózou,
- zhodnotit význam změn počtů CEC a EPC ve srovnání se zdravými kontrolami z hlediska potenciálního rizika vzniku nebo rekurence trombózy u pacientů se známou trombofilií, u kterých nebyl dle publikovaných prací význam CEC a EPC dosud hodnocen.

3. Materiál a metody

3.1. Soubor pacientů a kontrolních skupin

Jako cílový zkoumavý soubor byla vybrána skupina (n = 61) pacientů se známou trombofilií dispenzarizovaných na Trombotickém centru Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (VFN). Skupinu zdravých kontrol (n = 28) tvořili zdraví jedinci bez prokázané trombofilie či jiné nemoci. Kontrolní skupina s očekávanými zvýšenými počty endotelových progenitorových (EPC) a cirkulujících endotelových (CEC) buněk byla tvořena pacienty s hematologickými malignitami po vysokých dávkách chemoterapie (po autologní transplantaci kmenových buněk), pacienty se závažnými infekcemi (sepsí) a pacienty s akutním infarktem myokardu (n = 31). Všichni výše uvedení pacienti byli sledováni a vyšetřeni ve VFN. Výzkumný projekt byl schválen etickou komisí VFN.

3.2. Odběr biologického materiálu

Odběr periferní krve cílové skupiny pacientů i kontrolních skupin byl proveden standardizovaným postupem (uzavřený vakuový odběrový systém) s použitím K₃EDTA nebo K₂EDTA jako antikoagulačního činidla. Odběry byly provedeny v odběrovém centru VFN. Odebírání jedinci před odběrem nepožili alkohol, nekouřili a byli v klidu, všichni zároveň vyslovili souhlas s odběrem periferní krve. K následné laboratorní analýze nebyla použita první odebraná zkumavka.

3.3. Analýza krevního obrazu

Vzorky nesrážlivé periferní krve cílové patientské skupiny i obou kontrolních skupin byly po příjmu v Centrálních hematologických laboratořích (CHL) nejprve zkontrolovány, následně promíchány na válečkovém míchadle po dobu 10 minut, bezprostředně před měřením dále promíchány několikanásobným otočením zkumavek. Vzorky byly poté změřeny na krevním analyzátoru XN 3000 (Sysmex), pomocí kterého byly stanoveny parametry krevního obrazu. Analýza byla provedena při teplotě 15 – 25 °C maximálně do 5 hodin od odběru. Výsledky parametru WBC byly následně, po analýze průtokovou cytometrií, využity k výpočtu absolutních počtů cirkulujících endotelových (CEC) a endotelových progenitorových buněk (EPC).

3.4. Analýza na průtokovém cytometru

Vícebarevná imunofenotypizační analýza byla provedena z plné krve pomocí průtokového cytometru FACSVersé (BD Biosciences) a následné vyhodnocení naměřených dat pomocí softwaru Kaluza (Beckman Coulter). Průtokový cytometr byl nastaven dle mezinárodního standardního operačního postupu (SOP) EuroFlow (Kalina et al., 2012) a kontrola tohoto nastavení a stabilita přístroje byly sledovány denně pomocí kalibračních kuliček Rainbow (Spherotec) a kuliček CST (BD Biosciences). K analýze byly použity monoklonální protilátky namířené proti antigenům: CD3, CD45, CD117, CD144 (Beckman Coulter); CD31, CD34, CD146 (BD Biosciences); CD133 (MACS Miltenyi Biotec); CD309 (R&D Systems) (viz tabulka 3.1).

Tabulka 3.1. Seznam použitých monoklonálních protilátek s uvedením jejich klonů, fluorochromů, titrování objemu a výskytu v jednotlivých buněčných populacích.

Název (jiný)	Klon	Fluorochrom	Titř [μl]	Výskyt
CD3 (T3)	UCHT1	APC-Alexa Fluor 750	3	T lymfocyty
CD31 (PECAM-1)	WM59	FITC	10	monocyty, trombocyty, granulocyty, endotelové buňky, lymfocyty
CD34 (HPCA 1)	8G12	PerCP-Cy5.5	10	hematopoetické progenitorové buňky, endotelové buňky
CD45 (LCA)	J33	Krome Orange	5	leukocyty
CD117 (c-KIT)	104D2D1	PE-Cy7	5	hematopoetické progenitorové buňky, mastocyty
CD133 (AC-133)	AC133	APC	7	subpopulace progenitorových buněk, endotelové buňky, epitelové buňky
CD144 (VE-Cadherin)	TEA1/31	PE	10	endotelové buňky
CD146 (S-endo)	P1H12	PE	15	endotelové buňky, aktivované T lymfocyty
CD309 (KDR, VEGFR2)	89106	PE	10	endotelové buňky, hemangioblasty

Množství monoklonálních protilátek použitých pro značení periferní krve bylo stanoveno na základě doporučení výrobce a ověřeno, případně upraveno dle provedené titrace jednotlivých monoklonálních protilátek na vzorku periferní krve zdravého dárce. Optimální titrované koncentrace monoklonálních protilátek byly určeny srovnáním míry poklesu mediánu fluorescenční intenzity (MFI) testovaných koncentrací jednotlivých monoklonálních protilátek oproti jejich koncentraci doporučené výrobcem.

3.4.1. Příprava vzorků k měření na průtokovém cytometru

Vzorky nesrážlivé periferní krve byly zpracovány do 6 hodin od odběru. K jejich zpracování byl použit modifikovaný standardní operační protokol (SOP) pro objemnou lýzu dle EuroFlow (Kalina et al., 2012) určený pro panely ke stanovení minimální reziduální nemoci (MRD). Pro přípravu vzorku byl použit lyzační roztok FACS Lysing solution (BD Biosciences), 22% roztok sérového albuminu (Sanquin) a další roztoky připravené v lékárně VFN, jejichž příprava před použitím byla dokončena v laboratoři (viz tabulka 3.2).

Tabulka 3.2. Seznam roztoků připravovaných v lékárně VFN, jejich složení a dokončení přípravy na pracovišti CHL.

Název roztoku (pH)	Složení (g/l)	Dokončení v laboratoři
Fosfátový pufr PBS (pH = 7,2)	Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O (3,73) KH ₂ PO ₄ (0,43) NaCl (7,2) H ₂ O	K 1 litru roztoku PBS přidat 20 ml 22% roztoku BSA a 10 ml 10% roztoku azidu sodného.
Lyzační roztok koncetrovaný (pH = 7,2 – 7,4)	NH ₄ Cl (8,26) KHCO ₃ (1,09) Chelaton III (0,037) H ₂ O	Před použitím naředit roztok v poměru 1:9 destilovanou vodou.
Azid sodný	NaN ₃ (10%) H ₂ O	Připraven k použití.

Vzorky periferní krve byly nejprve míchány po dobu 10 minut na válečkovém míchadle a následně promíchány několikanásobným otočením zkumavek. Poté byly 4 ml periferní krve každého pacienta převedeny do zkumavek o objemu 50 ml, doplněny 40 ml naředěného lyzačního roztoku (lékárna VFN) a inkubovány 5 minut při laboratorní

teplotě, během inkubace byly vzorky promíchávány inverzí zkumavek. Po inkubaci byly vzorky stočeny na centrifuze (Hettich) po dobu 5 minut při zrychlení 540×g, supernatant byl dekantován. Vzorky byly následně dvakrát promyty ve 40 ml PBS (centrifugace 5 minut, 540×g), přičemž pelety byly resuspendovány opakovanou inverzí zkumavek. Po druhém promytí byl supernatant dekantován a peleta resuspendována pomocí vortexu (VELP Scientifica) nebo automatické pipety (Eppendorf).

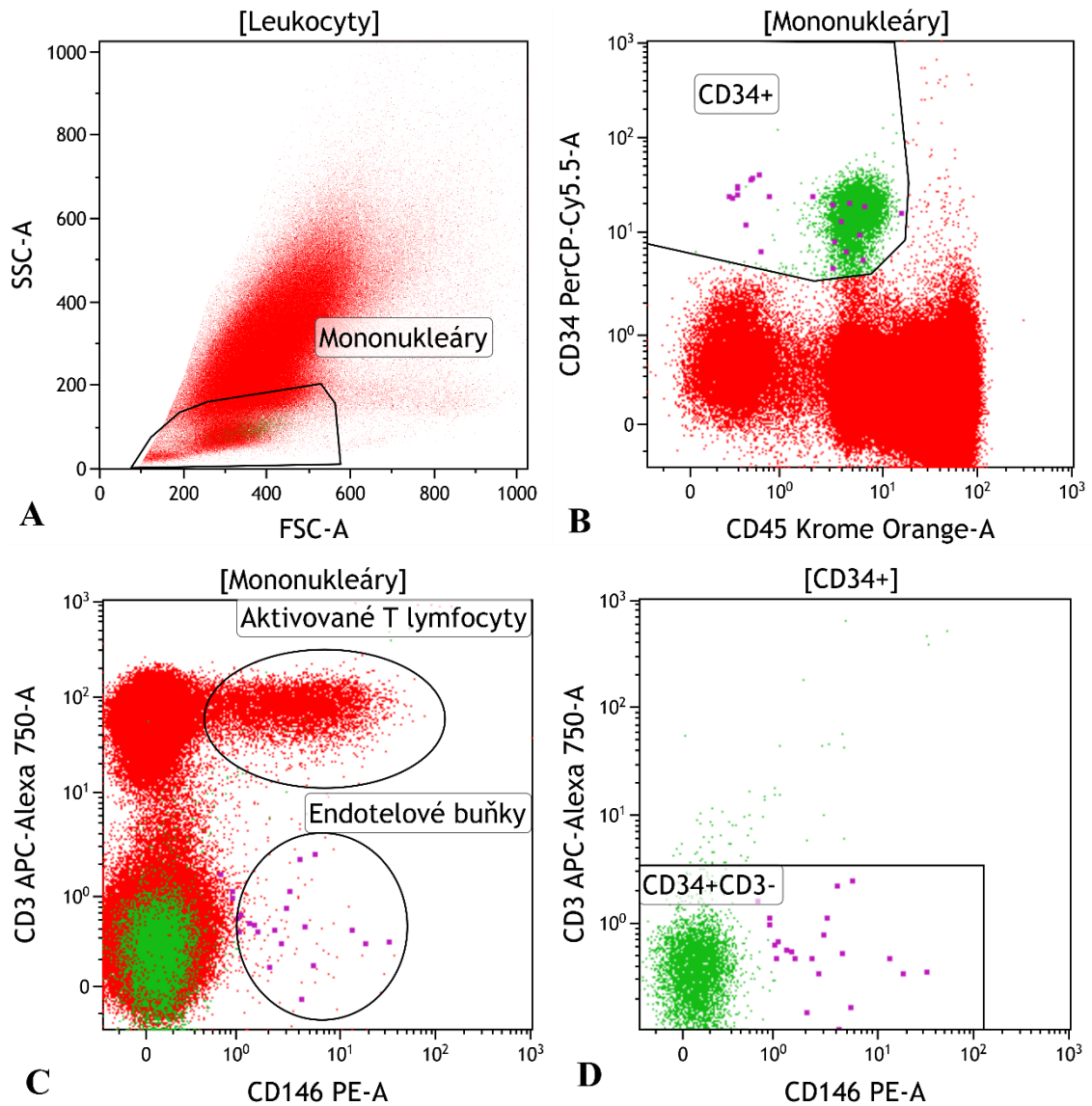
Takto připravené vzorky byly převedeny do zkumavek o objemu 5 ml a nejprve inkubovány 15 minut ve tmě za laboratorní teploty s FcR blokačním činidlem (MACS Miltenyi Biotec). Poté byly přidány konkrétní monoklonální protilátky o titrovaném objemu (viz tabulka 3.1), vzorky byly dobře promíchány na vortexu a inkubovány 15 minut ve tmě za laboratorní teploty. Po inkubaci byl ke každému vzorku přidán 1 ml lyzačního činidla (BD Biosciences), vzorky byly řádně promíchány na vortexu a inkubovány 10 minut ve tmě za laboratorní teploty na horizontální třepačce (Edmund Bühler). Vzorky byly následně stočeny na centrifuze (5 minut, 540×g), supernatant byl dekantován. Vzorky byly poté promyty ve 2 ml PBS (centrifugace 5 minut, 540×g), supernatant dekantován a peleta resuspendována v 0,1 ml PBS. Takto připravené vzorky byly do změření na průtokovém cytometru uchovávány v lednici při 2 – 8 °C po dobu maximálně 1 hodiny.

Všechny vzorky byly změřeny při stejném nastavení průtokového cytometru a vždy byly načteny minimálně 2 miliony leukocytů.

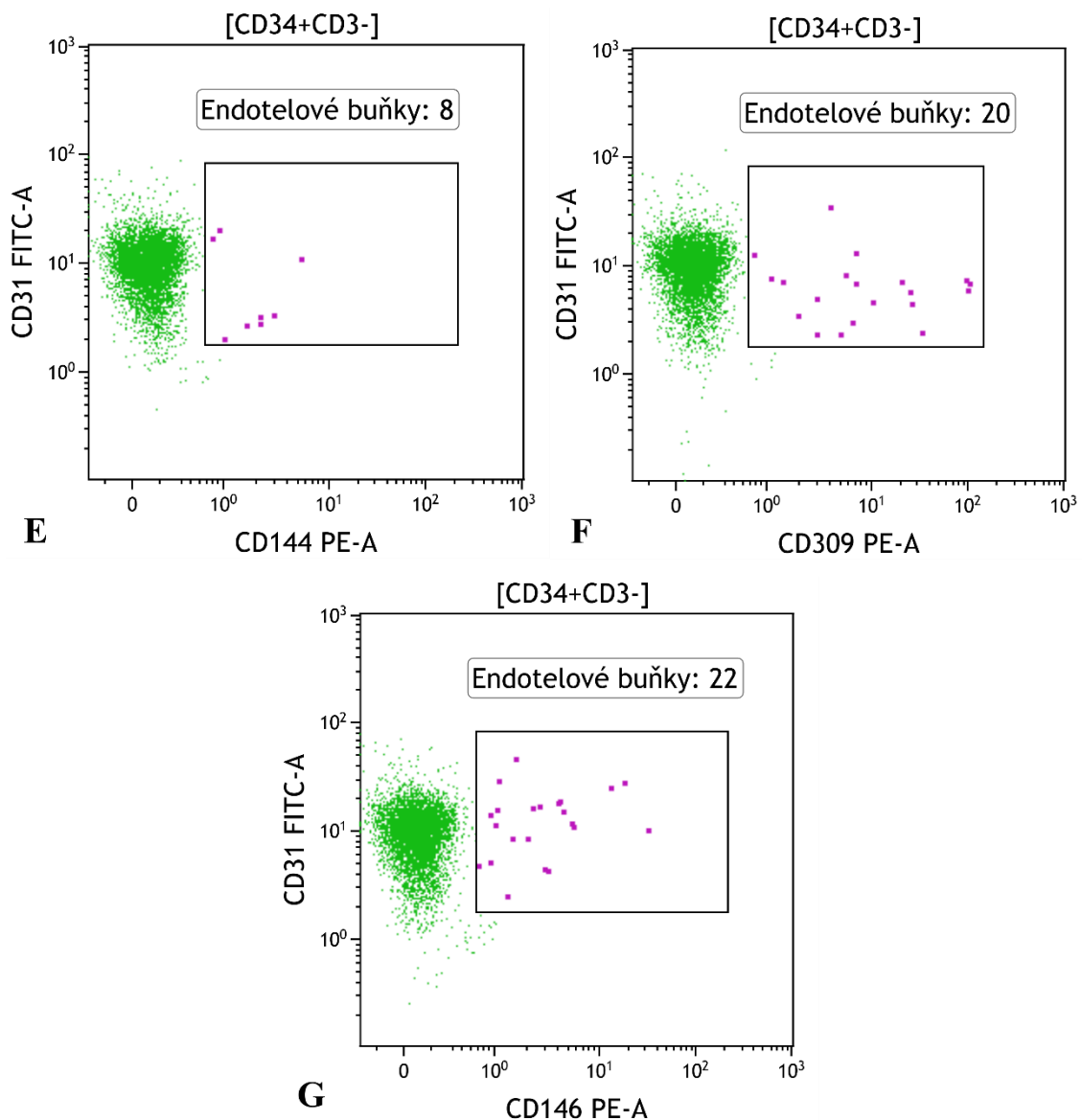
3.4.2. Výběr liniově specifického endoteliálního znaku

Pro identifikaci endotelové buněčné linie byly na základě publikovaných dat testovány tři monoklonální protilátky, anti-CD144, anti-CD146 a anti-CD309 (KDR), všechny konjugované s fluorochromem PE (viz tabulka 3.1). Testování bylo provedeno na souboru pěti vzorků periferní krve s očekávanými zvýšenými počty endotelových buněk v cirkulaci, přičemž všechny vzorky periferní krve byly připraveny stejným způsobem (viz kapitola 3.4.1). V rámci testování byl srovnán celkový počet identifikovaných endotelových buněk, intenzita exprese jednotlivých znaků a přítomnost či nepřítomnost přirozené pozitivní, respektive negativní kontrolní populace pro jednotlivé znaky. Znak CD146 vykazoval ve srovnání se znaky CD144 a CD309 nejvyšší počty nalezených endotelových buněk, dobrou intenzitu exprese na endotelových

buňkách a oproti ostatním dvěma znakům je exprimován na subpopulaci T lymfocytů, která tak může sloužit jako přirozená pozitivní kontrola jeho správné exprese (viz obrázek 3.1). Znak CD146 byl proto vybrán jako nejvhodnější specifický marker endotelové buněčné linie a byl v rámci této práce použit jako hlavní identifikační marker endotelových buněk v cirkulaci.



Obrázek 3.1. – první část. Stanovení endoteliálního liniového znaku. Endotelové buňky byly identifikovány na základě exprese znaku CD34 a CD45 (B) na populaci mononukleárních buněk (A), negativity znaku CD3 (D) a pozitivity znaku CD31. Znak CD146 byl pozitivní jak na endotelových buňkách, tak i na aktivovaných T lymfocytech (C).

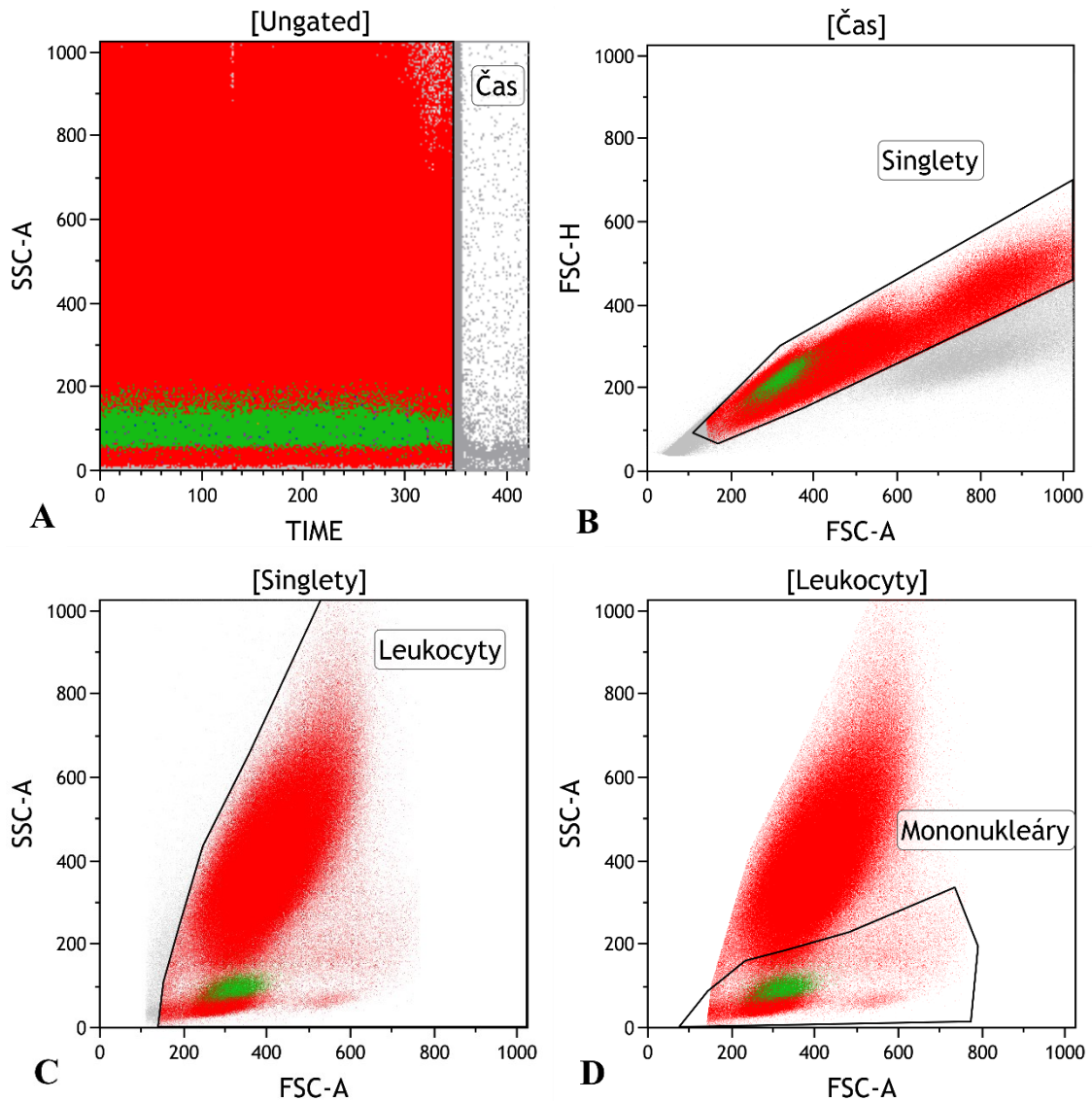


Obrázek 3.1. – pokračování. Stanovení endoteliálního liniového znaku. Srovnání exprese znaků CD144 (E), CD309 (F) a CD146 (G) na endotelových buňkách včetně uvedených počtů identifikovaných buněk.

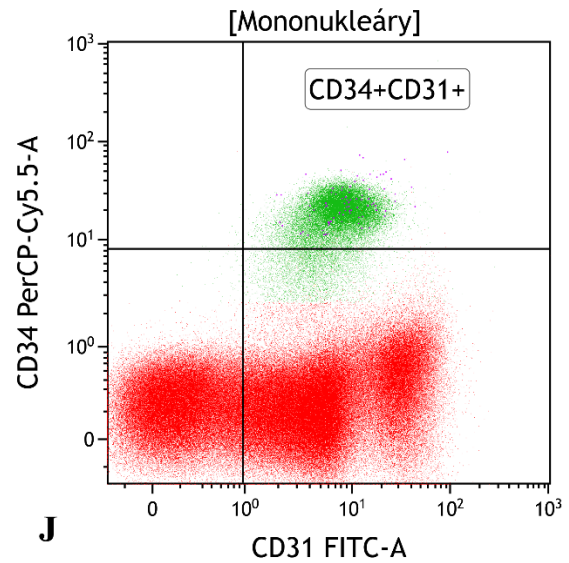
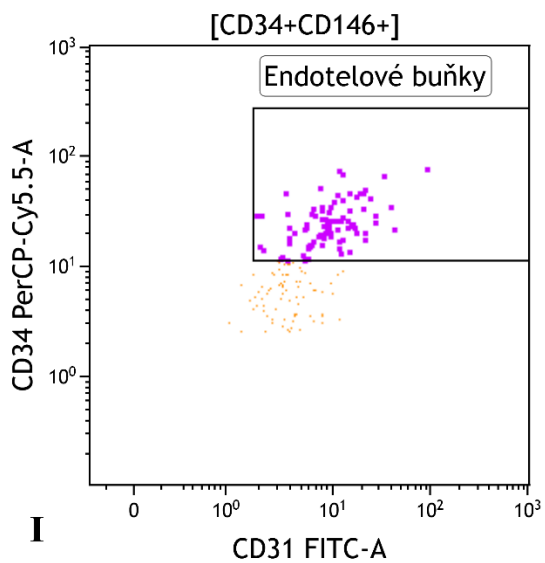
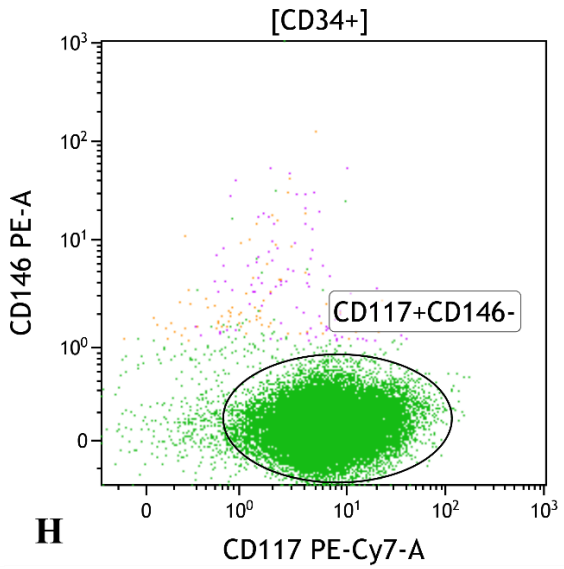
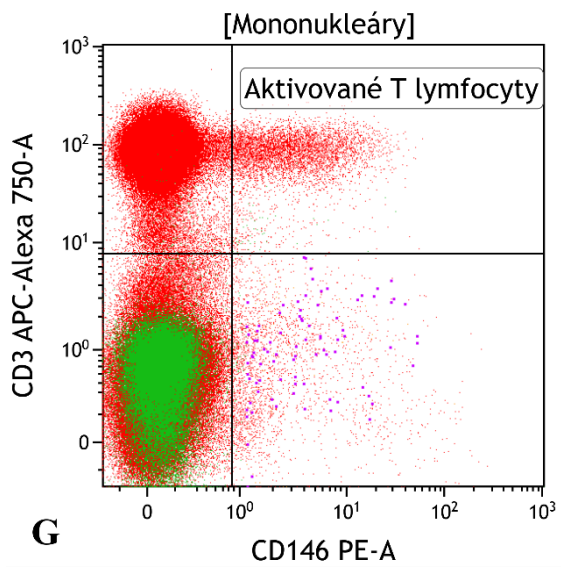
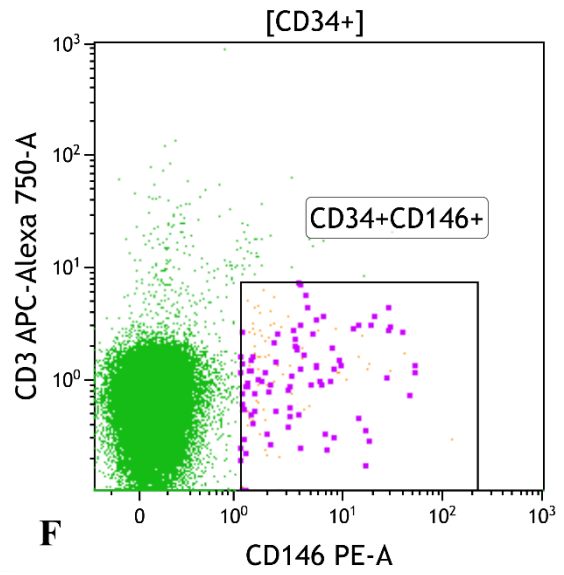
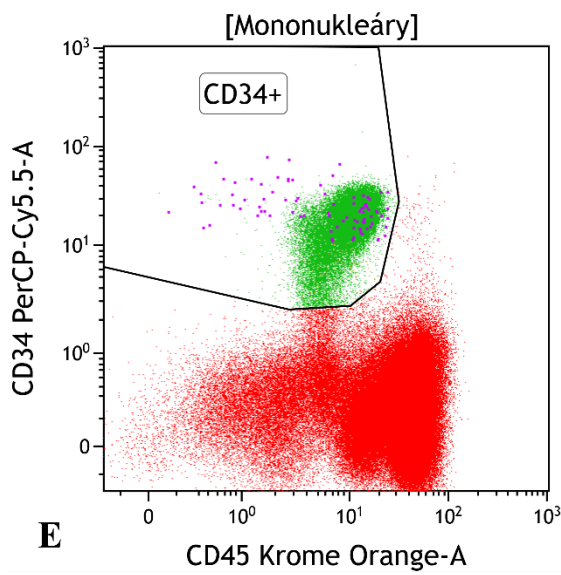
3.4.3. Postup gatování a identifikace endotelových buněk a jejich subpopulací

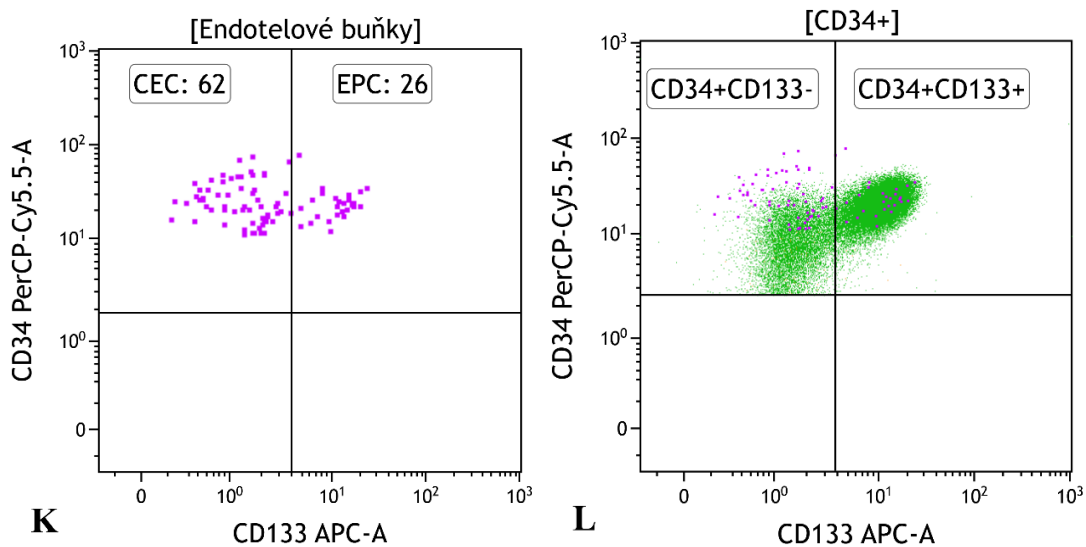
Správná posloupnost gatování, tzn. označování určitých oblastí či populací buněk, na bodových grafech zahrnuje několik kroků, které by měly být obecně vždy dodržovány. Nejprve byl na grafu vynesena čas, na základě kterého byly gatovány správně a kontinuálně načtené buňky (viz obrázek 3.2 A). Dále byly na grafu s vnesenými parametry dopředného rozptylu (FSC-A a FSC-H) odstraněny buňky s nesprávně navázanými protilátkami, tzv. doublety (viz obrázek 3.2 B). Na grafu s parametry FSC-

A vs SSC-A byly gatovány leukocyty, respektive všechny jaderné buňky a odstraněny rozpadlé buňky a debris, které vykazují nízké hodnoty FSC-A a SSC-A (viz obrázek 3.2 C), zároveň byly pomocí těchto parametrů identifikovány mononukleární buňky, které zahrnují i endoteliální buněčnou linii (viz obrázek 3.2 D).



Obrázek 3.2. – první část. Hierarchie gatování pro identifikaci endotelových buněk v cirkulaci. Gatování leukocytů a mononukleárních buněk (A-D).





Obrázek 3.2. – pokračování. Hierarchie gatování pro identifikaci endotelových buněk v cirkulaci. Identifikace endotelových a hematopoetických progenitorových buněk v cirkulaci (E-J). Stanovení subpopulací endotelových buněk, CEC a EPC, včetně vyznačených počtů buněk jednotlivých subpopulací (K, L).

V dalším postupném gatování byly z mononukleárních buněk na grafu s vynesnými znaky CD45 vs CD34 označeny CD34 pozitivní a CD45 slabě pozitivní až negativní buňky, které zahrnovaly hematopoetické progenitorové buňky a buňky endotelové (viz obrázek 3.2 E). Z těchto buněk byly na grafu CD146 vs CD3 označeny buňky pozitivní na znak CD146 a negativní na znak CD3 (viz obrázek 3.2. F), hranice positivity těchto znaků byla stanovena na základě pozitivní kontrolní subpopulace aktivovaných (CD3+CD146+) T lymfocytů (viz obrázek 3.2. G). Přítomnost hematopoetických progenitorových buněk byla ověřena na grafu CD117 vs CD146, kde byla tato CD34+ populace identifikována jako CD117+CD146- (viz obrázek 3.2 H). Populace endotelových buněk (CD34+CD146+) byla potvrzena na grafu CD31 vs CD34, kde vykazovala silnou pozitivitu znaku CD34 a pozitivitu znaku CD31 (viz obrázek 3.2 I), přičemž hranice positivity znaku CD31 byla stanovena na základě přirozené pozitivní kontrolní subpopulace lymfocytů (viz obrázek 3.2 J). Jednotlivé subpopulace endotelových buněk v cirkulaci, tj. CEC a EPC, byly identifikovány na grafu CD133 vs CD34 jako CD133 negativní, respektive CD133 pozitivní subpopulace (viz obrázek 3.2 K). Hranice positivity znaku CD133 byla určena na základě positivity přirozené pozitivní kontrolní populace hematopoetických progenitorových buněk (viz obrázek 3.2 L).

3.5. Výpočet absolutního zastoupení subpopulací endotelových buněk v cirkulaci

Absolutní zastoupení jednotlivých subpopulací (CEC a EPC) endotelových buněk v periferní krvi bylo vypočteno na základě výsledků parametru WBC z krevního obrazu a zjištěných počtů buněk leukocytů a endotelových buněčných subpopulací identifikovaných pomocí vícebarevné průtokové cytometrie dle následujících rovnic:

$$\text{CEC absolutně [ml}^{-1}\text{]} = (\# \text{ CEC} / \# \text{ Leukocyty}) \times \text{WBC} \times 10^6,$$

$$\text{EPC absolutně [ml}^{-1}\text{]} = (\# \text{ EPC} / \# \text{ Leukocyty}) \times \text{WBC} \times 10^6,$$

kde parametry # CEC, # EPC a # Leukocyty vyjadřují počet buněk CEC, EPC a leukocytů zjištěných analýzou na průtokovém cytometru a parametr WBC vyjadřuje počet leukocytů v jednom litru periferní krve [10^9 l^{-1}] zjištěný analýzou krevního obrazu.

3.6. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena prostřednictvím softwaru Statistica 12 (StatSoft CR). Celková statistická významnost byla vypočtena metodou ANOVA, jednotlivé skupiny byly srovnány na základě Mann-Whitneyho U testu, přičemž výsledky o hodnotě $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Jako detekovatelné byly považovány jednotlivé buněčné populace, jejichž počet byl vyšší než limit detekce metody (LoD). Za nejnižší detekovatelný počet buněk v rámci jedné populace bylo považováno 20 buněk, což představuje obecně používanou hodnotu LoD např. pro vysoce citlivé analýzy sledování minimální reziduální nemoci po léčbě (Rawstron et al., 2013). Limit detekce metody vícebarevné průtokové cytometrie byl vypočten dle následující rovnice:

$$\text{LoD [\%]} = (20 / \# \text{ Leukocyty}) \times 100,$$

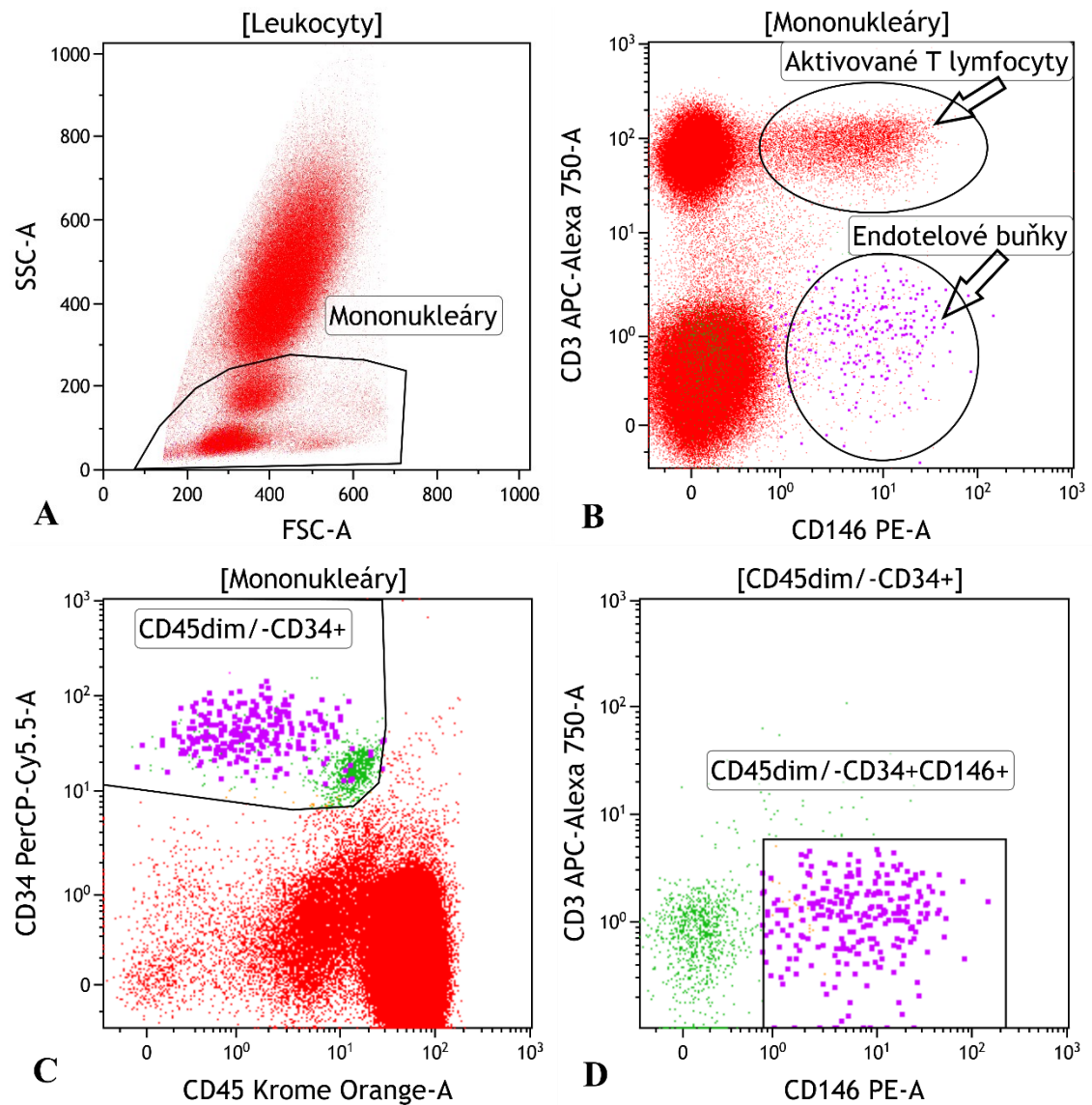
kde parametr # Leukocyty vyjadřuje počet buněk leukocytů zjištěných analýzou na průtokovém cytometru.

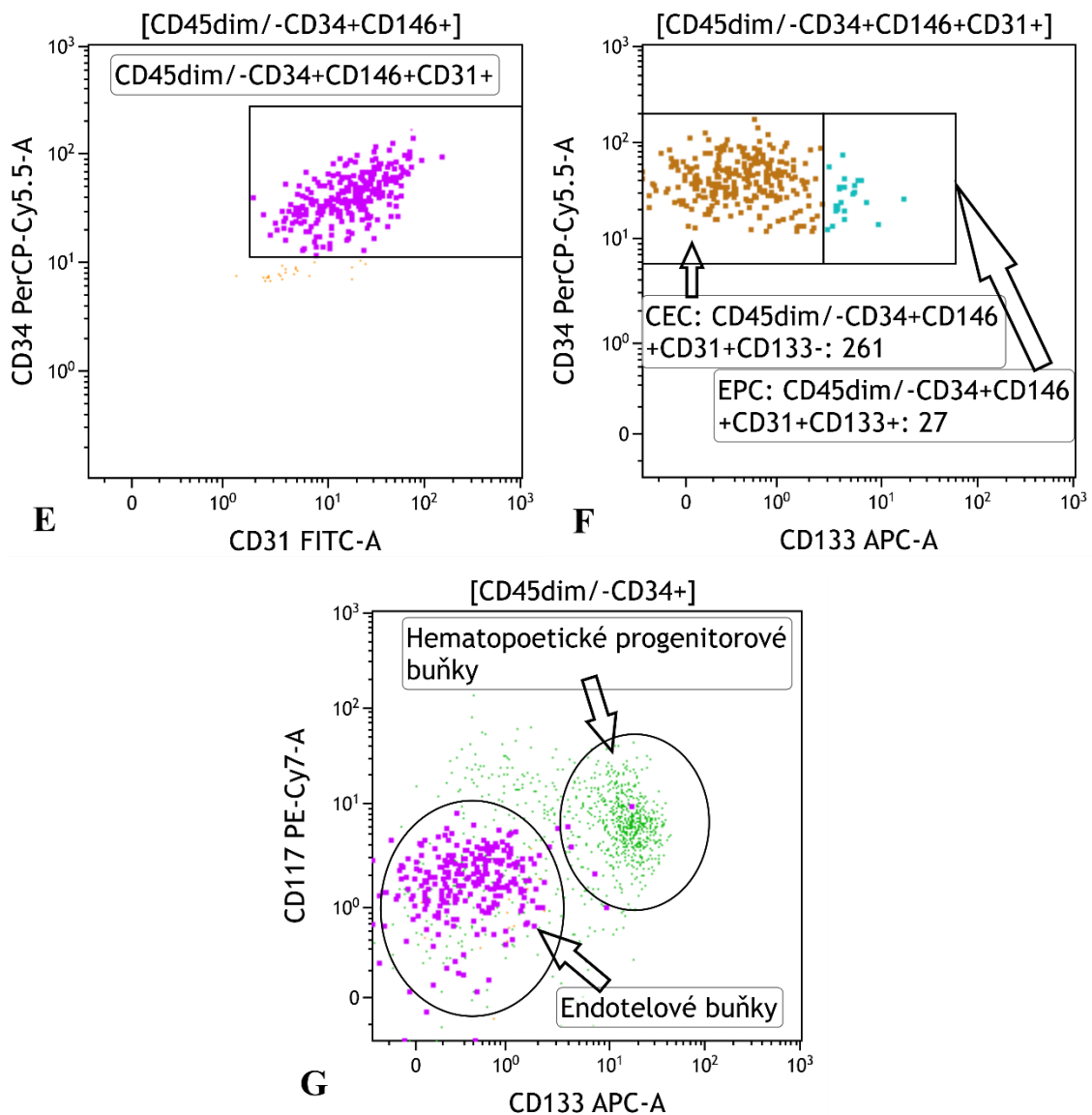
Na rozmezí výsledných hodnot absolutních počtů buněčných subpopulací CEC a EPC byl aplikován 90% interval spolehlivosti.

4. Výsledky

4.1. Stanovení imunofenotypu endotelových buněčných subpopulací

V rámci této práce byl optimalizován panel monoklonálních protilátek ke stanovení cirkulujících endotelových (CEC) a endotelových progenitorových (EPC) buněk na základě jejich imunofenotypu. Stanovení imunofenotypu bylo provedeno na souboru pacientů s očekávanými zvýšenými počty CEC a EPC (viz kapitola 3.1). Pro určení příslušnosti buněk k endoteliální buněčné linii byl použit liniově specifický marker CD146 (S-endo). Tento marker je zároveň exprimován subpopulací aktivovaných T lymfocytů, které tak v kombinaci s T lymfocytárním markerem CD3 může sloužit jako interní pozitivní kontrola (viz obrázek 4.1 B).





Obrázek 4.1. Stanovení imunofenotypu endotelových buněčných subpopulací (CEC a EPC) v periferní krvi. Vyznačené mononukleární buňky (A), aktivované T lymfocyty jako pozitivní kontrola znaku CD146 (B), endotelové buňky (B, G) a hematopoietické progenitorové buňky (G). Postupné gatování a stanovení imunofenotypu CEC a EPC včetně uvedení detekovaných počtů buněk (C-F).

Na základě naší analýzy byl stanoven imunofenotyp CEC jako CD45 negativní až slabě pozitivní, CD34 silně pozitivní, CD146 pozitivní, CD31 pozitivní, CD133 negativní a imunofenotyp EPC jako CD45 negativní až slabě pozitivní, CD34 silně pozitivní, CD146 pozitivní, CD31 pozitivní, CD133 pozitivní (viz obrázek 4.1 C-F). Hematopoietické progenitorové buňky vykazovaly imunofenotyp CD45 slabě pozitivní, CD34 pozitivní, CD146 negativní, CD133 pozitivní, CD117 pozitivní (viz obrázek 4.1 G).

4.2. Stanovení referenčních hodnot CEC a EPC

Pro stanovení normálního rozmezí hodnot CEC a EPC v periferní krvi byla použita skupina (n = 28) zdravých dárců bez prokázané vrozené trombofilie. Byly změřeny krevní vzorky od 19 žen s rozmezím věku 18 – 64 let a 9 mužů s rozmezím věku 18 – 50 let, přičemž nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v počtech CEC a EPC mezi pohlavími (p = 0,9216, respektive p = 0,4606). Medián absolutního počtu buněk v 1 ml periferní krve byl pro CEC stanoven na 14,2 (rozmezí 3,1 – 51,9) a pro EPC na 2,8 (rozmezí 0 – 30,2) (viz tabulka 4.1).

Tabulka 4.1. Klinická a demografická data cílové patientské skupiny, kontrolní patientské skupiny a skupiny zdravých kontrol. Kvantifikace endotelových buněčných subpopulací, CEC a EPC.

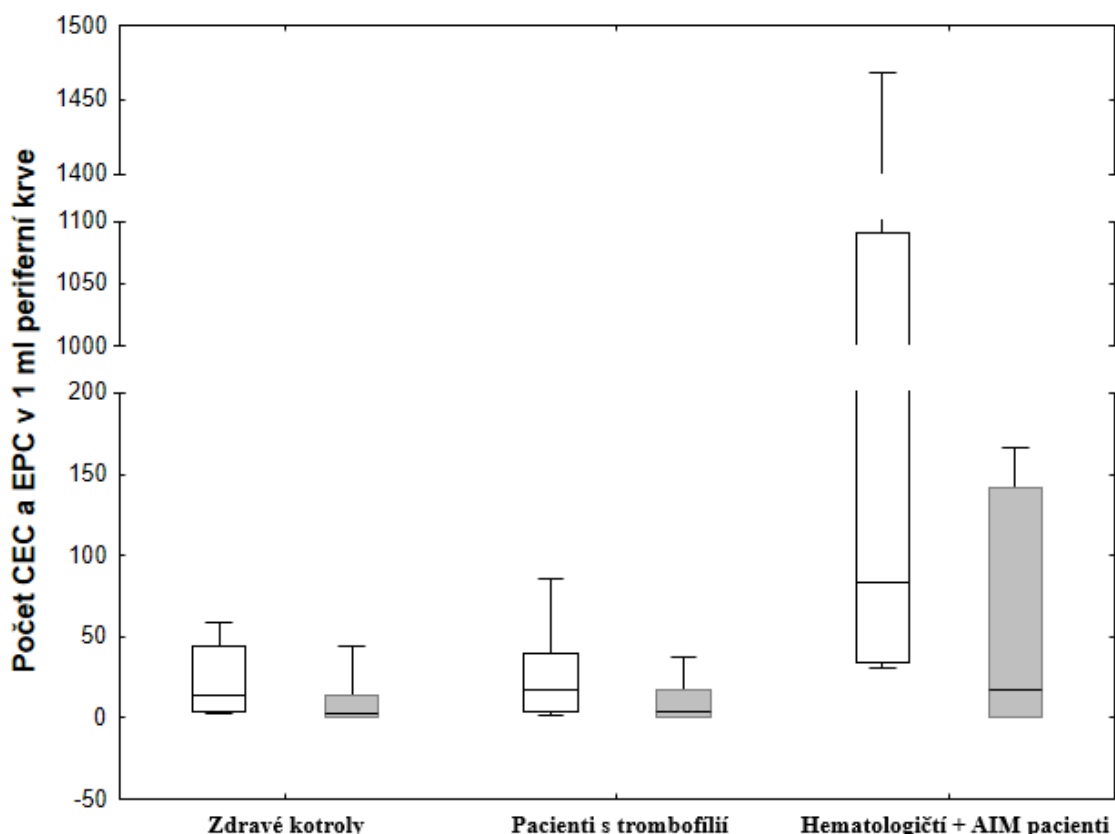
Skupina (počet)	Pacienti s trombofilií (n = 61)	Zdravé kontroly (n = 28)	Hematologičtí a AIM pacienti (n = 31)
Medián věku (rozmezí)	46 (25 – 82)	33 (18 – 64)	61 (19 – 81)
Pohlaví (žena:muž)	28:33	19:9	7:24
Počet pacientů s VTE anamnézou (%)	31 (50,8)	0 (0)	3 (9,7)
Počet pacientů s trombofilií (%)	61 (100)	0 (0)	1 (3,2)
- FV Leiden ¹ (%)	37 (60,7)		1 (3,2)
- FII Protrombin heterozygot (%)	7 (11,5)		0 (0)
- Zvýšení FVIII (%)	17 (27,9)		0 (0)
- Deficit antitrombinu (%)	1 (1,6)		0 (0)
- Deficit proteinu C (%)	1 (1,6)		0 (0)
Medián počtu CEC v 1 ml PK (rozmezí)	17,7 (3,1 – 40,0)	14,2 (3,1 – 51,9)	82,9 (32,8 – 1241,4)
Medián počtu EPC v 1 ml PK (rozmezí)	3,5 (0 – 20,5)	2,8 (0 – 30,2)	17,8 (0 – 151,7)

Poznámka: ¹ Homozygotní mutace – 1, heterozygotní mutace – 36. Rozmezí bylo stanoveno jako 90% interval spolehlivosti populace.

Vysvětlivky: AIM, akutní infarkt myokardu; PK, periferní krev; VTE, žilní tromboembolizmus.

4.3. Stanovení hodnot CEC a EPC u pacientů s vrozenou trombofilií

Skupina pacientů se známou vrozenou trombofilií ($n = 61$) zahrnovala pacienty s mutací FV Leiden (homozygot i heterozygot) a FII protrombin (heterozygot), deficitem antitrombinu a proteinu C nebo vzestupem hladiny FVIII. Analyzováno bylo 28 žen a 33 mužů s věkovým rozmezím od 25 do 82 let (viz tabulka 4.1). Třicet jedna pacientů mělo pozitivní historii trombózy, zatímco třicet pacientů bylo bez průkazu dřívější trombózy. Nebyly zjištěny žádné významné změny v počtech CEC ($p = 0,7605$) nebo EPC ($p = 0,2811$) ve srovnání se skupinou zdravých kontrol (viz obrázek 4.2). Prokázány nebyly ani statisticky významné rozdíly v hladinách CEC ($p = 0,5786$) a EPC ($p = 0,1917$) mezi skupinou pacientů s nebo bez historie trombózy. Medián absolutního počtu buněk v 1 ml periferní krve byl pro CEC stanoven na 17,7 (rozmezí 3,1 – 40,0) a pro EPC na 3,5 (rozmezí 0 – 20,5) (viz tabulka 4.1).



Obrázek 4.2. Srovnání absolutních počtů CEC (bílý krabicový graf) a EPC (šedý krabicový graf) v jednom ml periferní krve cílové pacientské skupiny, kontrolní pacientské skupiny a skupiny zdravých kontrol. Rozmezí krabicového grafu bylo stanoveno jako 90% interval spolehlivosti. V grafech jsou vyznačeny hodnoty mediánu, minima a maxima.

Vysvětlivky: AIM, akutní infarkt myokardu.

4.4. Stanovení hodnot CEC a EPC u pacientů s akutní trombózou

Skupina pacientů s akutní trombózou zahrnovala dvě ženy ve věku 44 a 70 let a jednoho muže ve věku 65 let, u dvou pacientů byla prokázána ileofemorální žilní trombóza a jeden pacient měl plicní embolii s trombem v pravé síni. U těchto pacientů byly prokázány normální hodnoty CEC a EPC. Medián absolutního počtu buněk v 1 ml periferní krve vykazoval u CEC hodnotu 29,7 (rozmezí 6,6 – 57,3) a u EPC hodnotu 3,4 (rozmezí 3,3 – 16,0).

4.5. Stanovení hodnot CEC a EPC u skupiny kontrolních pacientů

Skupina pacientů s očekávanými zvýšenými počty CEC a EPC ($n = 31$) zahrnovala pacienty s akutním infarktem myokardu, pacienty se závažnými infekcemi (sepsí) a hematologické pacienty s malignitami po vysokých dávkách chemoterapie (po autologní transplantaci kmenových buněk). Skupina zahrnovala 7 žen a 24 mužů s rozmezím věku od 19 do 81 let, přičemž tři pacienti měli pozitivní anamnézu žilního tromboembolizmu a 1 pacient měl prokázanou vrozenou trombofilií (viz tabulka 4.1). Zvýšené počty CEC, ale ne EPC, byly detekovány u dvou pacientů s akutním infarktem myokardu. Statisticky významné zvýšení hladin CEC ($p < 0,0001$) bylo zjištěno u pacientů s hematologickými malignitami po vysokých dávkách chemoterapie a u pacientů se závažnými infekcemi ($n = 29$), u kterých medián absolutního počtu CEC v 1 ml periferní krve vykazoval hodnotu 82,9 (rozmezí 32,8 – 1241,4). Tito pacienti měli také ve srovnání se zdravými kontrolami významně zvýšené hladiny EPC ($p < 0,0001$), přičemž medián absolutního počtu EPC měl hodnotu 17,8 (rozmezí 0 – 151,7) (viz obrázek 4.2). Avšak počet EPC vyšší než limit detekce metody byl prokázán pouze ve čtyřech případech.

5. Diskuze

Žilní i arteriální trombóza představují v dnešní době závažná onemocnění, která souvisí s vysokou mírou morbidity a mortality a významně zhoršují prognózu pacienta na přežití (Kvasnička, 2003a). Žilní tromboembolizmus se klinicky projevuje především jako hluboká žilní trombóza a plicní embolie (Behravesch et al., 2017), zatímco atherotrombóza jako akutní koronární syndrom a cévní mozková příhoda (Jackson, 2011). Ke vzniku či rekurenci trombóz přispívají predispoziční stavy, které jsou známy jako stavy trombofilní. Ty jsou primárně způsobeny poruchami krevních destiček, leukocytů, endotelu, zánětlivých cytokinů, metabolismu atd (Kvasnička, 2003a). Trombofilie mohou být buď vrozené (geneticky podmíněné) nebo získané. Mezi vrozené abnormality spojené s vysokým rizikem trombóz řadíme deficit antitrombinu a proteinu C nebo proteinu S, mutace FV Leiden a G20210A mutace protrombinu. Příkladem získané trombofilie je antifosfolipidový syndrom. Nicméně mnoho dalších získaných stavů může zvýšit riziko trombóz, jedná se například o zvýšené hladiny FVIII nebo deficit přirozených antikoagulancií, ale také závažná onemocnění (např. myeloproliferativní onemocnění) (Weitz et al., 2004, Rabinovich et al., 2014). Pro klinickou praxi je důležité tyto trombofilie včas odhalit a včasnou profylaxí zabránit vzniku či rekurenci trombózy. Vzhledem k tomu, že trombofilie představují multifaktoriální onemocnění zapříčiněná celou řadou poruch, nestačí k jejich diagnostice pouze provedení molekulárně genetických vyšetření, ale je potřeba široká škála laboratorních vyšetření. V patofyziologii trombotických stavů mají klíčovou roli krevní destičky ve vztahu s endotelem, který ztrácí své protitrombotické vlastnosti (Kvasnička, 2003a). Vlivem různých patologických stimulů dochází buď k poškození endotelové vrstvy, aktivaci endotelových buněk a jejich následnému uvolnění do cirkulace, kde jsou detekovatelné jako cirkulující endotelové buňky (CEC) (Erdbuegger et al., 2006a) nebo dochází k manifestaci endotelových progenitorových buněk (EPC) v kostní dřeni a jejich následnému uvolnění do cirkulace (Boos et al., 2006), kde interagují s aktivovanými krevními destičkami, kterými jsou naváděny do míst poškození cévní stěny a dovnitř trombu (Lev et al., 2006), kde se uplatňují v procesu neovaskularizace (Li and Li, 2016). Sledování těchto markerů aktivity endotelu tak proto může odrážet i aktivitu krevních destiček.

Počet CEC a EPC se obvykle pohybuje pod 50 buněk v jednom ml periferní krve (Lanuti et al., 2016), proto je volba optimálního postupu přípravy a analýzy zásadní v identifikaci

a kvantifikaci těchto vzácných buněk. Vzhledem k tomu, že na hladiny endotelových buněk v cirkulaci má vliv cvičení (Rehman et al., 2004) a kouření (Kondo et al., 2004) byly odebírané osoby před odběrem krve v klidu a nekouřily. Aby se zabránilo kontaminaci materiálu endotelovými buňkami uvolněnými při vpichu jehlou (Goon et al., 2005), nebyla k další analýze použita první odebraná zkumavka. V rámci této práce byla použita metoda vícebarevné průtokové cytometrie, konkrétně byl aplikován modifikovaný standardní operační protokol (SOP) pro objemnou lýzu dle EuroFlow, který umožňuje hodnocení velkého množství buněk v suspenzi a je tak přímo určený pro analýzu vzácných populací buněk (Kalina et al., 2012). Z důvodu zabránění potenciální ztráty buněk během přípravného postupu byla jako výchozí materiál použita plná krev bez izolace mononukleárních buněk hustotní gradientovou centrifugací, neboť byly pozorovány velké diskrepance v konečném počtu EPC srovnáním právě těchto dvou izolačních postupů (Van Craenenbroeck et al., 2008). Vzorky periferní krve byly zpracovány do šesti hodin od odběru, přičemž buňky byly nejprve inkubovány s FcR blokačním činidlem. Tím se minimalizovalo arteficiální zvýšení fluorescenční intenzity jednotlivých znaků, nespecifická vazba monoklonálních protilátek a snížilo se tak riziko falešně pozitivních výsledků. Nespecificky navázané protilátky (doublety), šum a debris, které by mohly také představovat falešně pozitivní výsledky (Van Craenenbroeck et al., 2008, Khan et al., 2005, Jamsa et al., 2011), byly odstraněny v rámci gatovací strategie (viz obrázek 3.2).

Kvůli nízkým počtům CEC a EPC v periferní krvi je naprosto nezbytné jasné stanovení jejich imunofenotypu pomocí kombinace specifických protilátek. Bohužel na základě publikovaných dat se výběr monoklonálních protilátek pro identifikaci CEC a EPC značně liší. Některé práce charakterizovaly CEC a EPC pouze na základě kombinace znaků CD45, CD34, CD133 a CD31. Antigen CD45 byl vždy negativní nebo slabě pozitivní, znaky CD34 a CD31 byly vždy pozitivní a znak CD133 byl použit k rozlišení CEC (CD133 negativní) od EPC (CD133 pozitivní) (Steurer et al., 2008, Obeid et al., 2015, Duda et al., 2007). Avšak tento panel monoklonálních protilátek neobsahuje žádný specifický endoteliální marker a nemůže být proto použit k jasné identifikaci CEC a EPC (Mitchell et al., 2017). Navíc antigeny CD133 a CD34 jsou exprimovány hematopoetickými progenitorovými buňkami (Wognum et al., 2003) a antigen CD31 není specifickým markerem endoteliální linie (Peichev et al., 2000). Toto bylo potvrzeno i naší analýzou (viz obrázek 3.2 H, L a obrázek 4.1 G), kde populace buněk CD34 pozitivní a

CD133 pozitivní, dříve popisovaná jako EPC, byla CD146 negativní a CD117 pozitivní. Tudíž hematopoetické progenitorové buňky byly nesprávně označovány jako endotelové buňky. Tyto výsledky potvrzují potřebu použití specifického endoteliálního liniového markeru. Další publikované práce uvádějí rozporuplná data s ohledem na rozšíření panelů monoklonálních protilátek k identifikaci CEC a EPC o více specifické endoteliální markery, jedná se zejména o znaky CD309 (KDR), CD146, CD144 nebo CD105 (Mancuso et al., 2009, Mobius-Winkler et al., 2009, Kraan et al., 2012, Alessio et al., 2013, Lanuti et al., 2016, Doyle et al., 2017, Huizer et al., 2017).

V rámci této práce byly ke stanovení příslušnosti buněk k endoteliální linii testovány znaky CD144, CD146 a CD309 (KDR) (viz obrázek 3.1). Jako zcela nevhodný se jevil znak CD144 (VE-Cadherin), který ve srovnání s ostatními testovanými znaky vykazoval nižší expresi i nižší počet cílových buněk (viz obrázek 3.1 E). Znaky CD309 (KDR) a CD146 (S-endo) vykazovaly srovnatelnou expresi i počet cílových buněk (viz obrázek 3.1 F, G). Ale pouze znak CD146 byl exprimován i na subpopulaci aktivovaných T lymfocytů (viz obrázek 3.1 C), jejichž pozitivita umožňuje použití těchto buněk jako interní pozitivní kontroly pro detekci endotelových buněk. Znak CD146 se tak jevil jako nejlepší marker pro identifikaci endotelových buněk.

V této dizertační práci byla k identifikaci CEC a EPC použita metoda vícebarevné průtokové cytometrie. Náš sedmi barevný panel zahrnoval leukocytární marker CD45 (LCA), endoteliální markery CD31 (PECAM-1) a CD146 (S-endo), hematopoetické progenitorové markery CD34 (HPCA 1), CD117 (c-KIT) a CD133 (AC-133); a T lymfocytární marker CD3 (T3) sloužící jako interní kontrola. Na základě našich měření na souboru kontrolní skupiny hematologických pacientů po vysokých dávkách chemoterapie, pacientů s akutním infarktem myokardu a pacientů se závažnými infekcemi s očekávanými zvýšenými počty endotelových buněk v cirkulaci bylo potvrzeno, že CEC vykazují expresi znaku CD45 negativní až slabě pozitivní, CD34 silně pozitivní, CD31 pozitivní, CD146 pozitivní a CD133 negativní. Zároveň mohou být CEC podle tohoto imunofenotypu spolehlivě kvantifikovány. EPC ve srovnání s CEC navíc exprimují hematopoetický progenitorový marker CD133, nicméně jejich kvantifikace je vzhledem k velmi nízkému počtu v periferní krvi velice obtížná a těsně se blíží hranici citlivosti metody průtokové cytometrie. Pro spolehlivou kvantifikaci EPC by byla potřeba načtení ještě většího celkového počtu buněk, a tudíž větší množství výchozího materiálu. Přesto námi zjištěná exprese znaku CD45 jako negativní až slabě pozitivní (viz obrázek

4.1 C) podporuje publikovaný konsenzus, že slabá exprese znaku CD45 se jeví jako nejlepší hodnocení z hlediska kvantifikace EPC (Fadini et al., 2012).

CEC a EPC představují velmi vzácné buněčné populace (Lanuti et al., 2016), proto je jejich kvantifikace velice obtížná a závisí na přesné a standardizované přípravě biologického materiálu a dobře definovaném stanovení jejich imunofenotypu. Použití naší standardizované přípravy periferní krve a optimalizovaného panelu monoklonálních protilátek umožňuje kvantifikovat počet CEC a EPC v plné periferní krvi. V rámci této práce byly na skupině zdravých kontrol bez prokázané trombofilie stanoveny referenční počty CEC (medián = 14,2) a EPC (medián = 2,8) v 1 ml periferní krve (viz tabulka 4.1), přičemž v počtech CEC ani EPC nebyly patrné žádné statisticky významné rozdíly mezi pohlavími ($p = 0,9216$, respektive $p = 0,4606$), a proto byly další testované skupiny hodnoceny bez ohledu na pohlaví. Stanoveny byly počty CEC (medián = 17,7) a EPC (medián = 3,5) v 1 ml periferní krve u pacientů s vrozenou trombofilií (viz tabulka 4.1), tyto počty byly ovšem velmi nízké a u CEC ani EPC se významně nelišily ($p = 0,7605$, respektive $p = 0,2811$) od zdravých kontrol (viz obrázek 4.2). V rámci této skupiny pacientů s vrozenými trombofiliemi bylo hodnoceno 31 pacientů s dřívější pozitivní anamnézou žilního tromboembolizmu a 30 pacientů bez anamnézy žilní trombózy, nicméně mezi těmito dvěma skupinami nebyl v počtech CEC ani EPC žádný statisticky významný rozdíl ($p = 0,5786$, respektive $p = 0,1917$). Normální počty CEC (medián = 29,7) a EPC (medián = 3,4) v 1 ml periferní krve byly ovšem prokázány také u třech pacientů s akutní trombózou. V tomto případě se však jednalo pouze o malou skupinu a bylo by vhodné zhodnotit hladiny CEC a EPC na větším souboru pacientů s akutní trombózou. Naproti tomu zvýšené hladiny v počtech CEC (medián = 82,9) i EPC (medián = 17,8) byly potvrzeny u pacientů s hematologickými malignitami po vysokých dávkách chemoterapie v rámci autologní transplantace kmenových buněk a u pacientů s akutním infarktem myokardu ve srovnání se zdravými kontrolami (obě $p < 0,0001$) (viz obrázek 4.2). V případě hladin EPC však byly počty buněk na hranici limitu detekce metody průtokové cytometrie a k jejich spolehlivé kvantifikaci by bylo potřeba použít větší množství výchozího materiálu periferní krve.

Hladiny CEC a EPC u pacientů s trombofilií ještě dosud nebyly stanovovány. Dle publikovaných prací ale byly prokázány výrazně a mírně zvýšené počty CEC při akutní, respektive chronické fázi hluboké žilní trombózy, přičemž v odstupu devíti až patnácti měsíců od akutní příhody opět došlo k jejich normalizaci, tzn. že sledování hladin CEC

by mohlo mít roli při odhalení trombózy a při regeneraci cévní stěny v souvislosti s léčbou hluboké žilní trombózy (Alessio et al., 2013). Změny v počtech EPC byly prokázány u pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním s trombotickými komplikacemi (Teofili et al., 2011). Přitom bylo navrženo, že EPC vazbou na krevní destičky regulují jejich funkci a tvorbu trombu (Abou-Saleh et al., 2009), zatímco aktivované krevní destičky zase navádějí EPC dovnitř trombu (Lev et al., 2006), kde se EPC uplatňují v procesu neovaskularizace a odstraňování trombu (Li and Li, 2016). Na základě výsledků této práce byl ve srovnání se zdravými kontrolami prokázán normální počet CEC a EPC u pacientů se známou trombofilií s nebo bez dříve prodělané trombózy (viz obrázek 4.2). Tento nálezn lze pravděpodobně přičítat faktu, že odběry vzorků krve těchto pacientů byly prováděny při pravidelné kontrole v rámci dlouhodobé dispenzarizace, a tudíž ani pacienti s dřívější anamnézou žilní trombózy aktuálně nevykazovali známky zvýšené trombogeneze (hladina D-dimerů) nebo dalších rizikových faktorů (pooperační stav apod.). Navíc přítomnost vrozené trombofilie sama o sobě neznamená, že u jejího nositele dojde někdy k tromboembolické příhodě. V rámci této práce ovšem nebyl prokázán ani zvýšený počet CEC a EPC u třech pacientů s akutní trombózou. Význam CEC a EPC jako markerů zvýšeného rizika vzniku či rekurence trombózy u pacientů se známými trombofiliemi bude proto muset být ještě předmětem dalšího studia, a to nejen s ohledem na přítomnost vrozené trombofilie, ale i dalších sekundárních rizikových faktorů. Potvrzena sice nebyla ani možná role CEC a EPC při sledování léčby hluboké žilní trombózy. Potenciál významu stanovování hladin CEC a EPC u pacientů s akutními trombózami je však nepochybně vyšší, ale zvláště v tomto případě bude ještě nutné provést další studie na větším souboru pacientů. Na druhé straně výsledky této práce potvrdily dříve publikovaná data ukazující zvýšené hladiny CEC a EPC u pacientů s kardiovaskulárními nemocemi (Massa et al., 2005, George et al., 2004, Mutin et al., 1999, Nadar et al., 2005, Bonello et al., 2006, Janssens et al., 1999, Makin et al., 2004, Chong et al., 2006, Bull et al., 2003) a v posttransplantačních podmínkách (Woywodt et al., 2004b, Popa et al., 2002).

6. Závěry

Na souboru kontrolní skupiny hematologických a kardiologických pacientů s očekávanými zvýšenými počty endotelových buněk v cirkulaci byla standardizována metoda vícebarevné průtokové cytometrie a optimalizován panel monoklonálních protilátek pro jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci CEC a EPC v periferní krvi.

Na souboru zdravých kontrol byly stanoveny referenční hodnoty počtu CEC a EPC v periferní krvi.

Na skupině pacientů s prokázanou vrozenou trombofilií, s anamnézou dřívějšího žilního tromboembolizmu nebo bez ní, byl kvantifikován počet CEC a EPC v periferní krvi.

Počet CEC a EPC byl také kvantifikován v periferní krvi třech pacientů s akutní trombózou.

Nebyla prokázána jednoznačná souvislost mezi zvýšeným rizikem vzniku či rekurence trombózy u pacientů s vrozenou trombofilií a počtem CEC a EPC v periferní krvi jako markerů odrážejících aktivitu endotelu a krevních destiček.

7. Shrnutí závěrů

Na závěr bych rád shrnul, že na základě této dizertační práce byl vyvinut standardizovaný protokol pro metodu vícebarevné průtokové cytometrie k rychlé a jednoznačné identifikaci a kvantifikaci endoteliálních buněčných subpopulací, CEC a EPC v periferní krvi.

Přesto nebyl prokázán významný rozdíl v počtech CEC a EPC u dlouhodobě sledovaných pacientů s vrozenými trombofiliemi ve srovnání s hodnotami CEC a EPC zdravých kontrol, které byly použity jako referenční meze. Změny v počtech CEC a EPC tak nemohou samostatně sloužit jako jednoznačné markery zvýšeného rizika vzniku či rekurence trombózy u pacientů s prokázanou trombofilií a přispět tak k včasnému odhalení tohoto rizika a zahájení profylaktické léčby. Další studie by se proto měla zaměřit na sledování hladin CEC a EPC u pacientů s prokázanou trombofilií i s ohledem na přítomnost dalších sekundárních trombofilních rizik. Stejně tak nebyl prokázán jednoznačně zvýšený počet CEC a EPC u pacientů s akutní trombózou oproti hodnotám zdravých kontrol. Nebyla tak potvrzena publikovaná data, že zvýšené hladiny CEC a EPC odráží akutní či chronickou fázi trombózy, přičemž po vyléčení dochází k normalizaci hodnot. Nicméně hladiny CEC a EPC byly v rámci této práce stanoveny pouze u třech pacientů s akutní trombózou, proto bude vhodné provést ještě další studie na větším souboru pacientů.

Na druhé straně na základě výsledků této práce byly jednoznačně potvrzeny významně zvýšené počty CEC u vybraných pacientů s hematologickými malignitami a u pacientů s akutním infarktem myokardu. Naše výsledky proto potvrzují dříve publikovaná data navrhuující, že CEC mohou sloužit jako marker poškození a dysfunkce endotelu. Citlivá metoda vícebarevné průtokové cytometrie používající liniově specifický endoteliální marker by mohla být preferovanou metodou pro identifikaci a kvantifikaci těchto buněk v dalších studiích.

8. Dedikace

Dizertační práce byla finančně podpořena Ministerstvem zdravotnictví České republiky (RVO-VFN 64165: Institucionální podpora – Projekt dlouhodobého koncepčního rozvoje výzkumné organizace) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (178315: Význam endoteliálních progenitorových buněk u trombofilních stavů).

9. Seznam použité literatury

- ABOU-SALEH, H., YACOUB, D., THEORET, J. F., GILLIS, M. A., NEAGOE, P. E., LABARTHE, B., THEROUX, P., SIROIS, M. G., TABRIZIAN, M., THORIN, E. & MERHI, Y. 2009. Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation*, 120, 2230-9.
- ALESSIO, A. M., BELTRAME, M. P., NASCIMENTO, M. C., VICENTE, C. P., DE GODOY, J. A., SILVA, J. C., BITTAR, L. F., LORAND-METZE, I., DE PAULA, E. V. & ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. 2013. Circulating progenitor and mature endothelial cells in deep vein thrombosis. *Int J Med Sci*, 10, 1746-54.
- ASAHARA, T., MUROHARA, T., SULLIVAN, A., SILVER, M., VAN DER ZEE, R., LI, T., WITZENBICHLER, B., SCHATTEMAN, G. & ISNER, J. M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275, 964-7.
- BARDIN, N., GEORGE, F., MUTIN, M., BRISSON, C., HORSCHOWSKI, N., FRANCES, V., LESAULE, G. & SAMPOL, J. 1996. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens*, 48, 531-9.
- BEAUCHAMP, N. J., MAKRIS, M., PRESTON, F. E., PEAKE, I. R. & DALY, M. E. 2000. Major structural defects in the antithrombin gene in four families with type I antithrombin deficiency--partial/complete deletions and rearrangement of the antithrombin gene. *Thromb Haemost*, 83, 715-21.
- BEEREPOOT, L. V., MEHRA, N., VERMAAT, J. S., ZONNENBERG, B. A., GEBBINK, M. F. & VOEST, E. E. 2004. Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol*, 15, 139-45.
- BEHRAVESH, S., HOANG, P., NANDA, A., WALLACE, A., SHETH, R. A., DEIPOLYI, A. R., MEMIC, A., NAIDU, S. & OKLU, R. 2017. Pathogenesis of Thromboembolism and Endovascular Management. *Thrombosis*, 2017, 3039713.
- BERTINA, R. M., KOELEMAN, B. P., KOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DIRVEN, R. J., DE RONDE, H., VAN DER VELDEN, P. A. & REITSMA, P. H. 1994. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369, 64-7.
- BITTENCOURT, C. R. O., IZAR, M. C. O., FRANCA, C. N., SCHWERZ, V. L., POVOA, R. & FONSECA, F. A. H. 2017. Effects of Chronic Exercise on Endothelial Progenitor Cells and Microparticles in Professional Runners. *Arq Bras Cardiol*, 108, 212-216.
- BLANN, A. D., WOYWODT, A., BERTOLINI, F., BULL, T. M., BUYON, J. P., CLANCY, R. M., HAUBITZ, M., HEBBEL, R. P., LIP, G. Y., MANCUSO, P., SAMPOL, J., SOLOVEY, A. & DIGNAT-GEORGE, F. 2005. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*, 93, 228-35.
- BOEHME, M. W., GALLE, P. & STREMMEL, W. 2002. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology*, 107, 340-349.
- BONELLO, L., BASIRE, A., SABATIER, F., PAGANELLI, F. & DIGNAT-GEORGE, F. 2006. Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease 1. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4, 979-981.
- BOOS, C. J., LIP, G. Y. & BLANN, A. D. 2006. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 48, 1538-47.
- BOUVIER, C. 1970. Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Thromb Diath Haemorrh*, 40, 163.
- BULL, T. M., GOLPON, H., HEBBEL, R. P., SOLOVEY, A., COOL, C. D., TUDER, R. M., GERACI, M. W. & VOELKEL, N. F. 2003. Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost*, 90, 698-703.
- BUTTHEP, P., RUMMAVAS, S., WISEDPANICHKIJ, R., JINDADAMRONGWECH, S., FUCHAROEN, S. & BUNYARATVEJ, A. 2002. Increased circulating activated endothelial cells, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor in thalassemia. *American journal of hematology*, 70, 100-106.

- CAPLICE, N. M., PANETTA, C., PETERSON, T. E., KLEPPE, L. S., MUESKE, C. S., KOSTNER, G. M., BROZE, G. J., JR. & SIMARI, R. D. 2001. Lipoprotein (a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood*, 98, 2980-7.
- CASE, J., MEAD, L. E., BESSLER, W. K., PRATER, D., WHITE, H. A., SAADATZADEH, M. R., BHAVSAR, J. R., YODER, M. C., HANELINE, L. S. & INGRAM, D. A. 2007. Human CD34+ AC133+ VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental hematology*, 35, 1109-1118.
- CATTO, A. J., KOHLER, H. P., COORE, J., MANSFIELD, M. W., STICKLAND, M. H. & GRANT, P. J. 1999. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood*, 93, 906-8.
- CLANCY, R., MARDER, G., MARTIN, V., BELMONT, H. M., ABRAMSON, S. B. & BUYON, J. 2001. Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis Rheum*, 44, 1203-8.
- COHEN, A. T., AGNELLI, G., ANDERSON, F. A., ARCELUS, J. I., BERGQVIST, D., BRECHT, J. G., GREER, I. A., HEIT, J. A., HUTCHINSON, J. L., KAKKAR, A. K., MOTTIER, D., OGER, E., SAMAMA, M. M., SPANNAGL, M. & EUROPE, V. T. E. I. A. G. I. 2007. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost*, 98, 756-64.
- COLMAN, R. W., HIRSCH, J., MARDER, V., SALZMAN, E. & FRANCIS, J. 1995. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 6, 147.
- CROFT, S. A., SAMANI, N. J., TEARE, M. D., HAMPTON, K. K., STEEDS, R. P., CHANNER, K. S. & DALY, M. E. 2001. Novel platelet membrane glycoprotein VI dimorphism is a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, 104, 1459-63.
- DAHLBACK, B. 1999. Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. *Semin Thromb Hemost*, 25, 273-89.
- DEL PAPA, N., COLOMBO, G., FRACCHIOLLA, N., MORONETTI, L. M., INGEGNOLI, F., MAGLIONE, W., COMINA, D. P., VITALI, C., FANTINI, F. & CORTELEZZI, A. 2004. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 50, 1296-1304.
- DIMMELER, S., HAENDELER, J., NEHLS, M. & ZEIHNER, A. M. 1997. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ice)-like and cysteine protease protein (cpp)-32-like proteases. *The Journal of experimental medicine*, 185, 601-608.
- DOGGEN, C. J., KUNZ, G., ROSENDAAL, F. R., LANE, D. A., VOS, H. L., STUBBS, P. J., MANGER CATS, V. & IRELAND, H. 1998. A mutation in the thrombomodulin gene, 127G to A coding for Ala25Thr, and the risk of myocardial infarction in men. *Thromb Haemost*, 80, 743-8.
- DOME, P., TELEKI, Z., RIHMER, Z., PETER, L., DOBOS, J., KENESSEY, I., TOVARI, J., TIMAR, J., PAKU, S. & KOVACS, G. 2009. Circulating endothelial progenitor cells and depression: a possible novel link between heart and soul. *Molecular psychiatry*, 14, 523-531.
- DOYLE, M. F., TRACY, R. P., PARIKH, M. A., HOFFMAN, E. A., SHIMBO, D., AUSTIN, J. H., SMITH, B. M., HUEPER, K., VOGEL-CLAUSSEN, J., LIMA, J., GOMES, A., WATSON, K., KAWUT, S. & BARR, R. G. 2017. Endothelial progenitor cells in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS One*, 12, e0173446.
- DUDA, D. G., COHEN, K. S., SCADDEN, D. T. & JAIN, R. K. 2007. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nat Protoc*, 2, 805-10.
- ERDBRUEGGER, U., HAUBITZ, M. & WOYWODT, A. 2006a. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta*, 373, 17-26.

- ERDBRUEGGER, U., WOYWODT, A., KIRSCH, T., HALLER, H. & HAUBITZ, M. 2006b. Circulating endothelial cells as a prognostic marker in thrombotic microangiopathy. *Am J Kidney Dis*, 48, 564-70.
- ESTES, M. L., MUND, J. A., INGRAM, D. A. & CASE, J. 2010. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr Protoc Cytom*, Chapter 9, Unit 9 33 1-11.
- FADINI, G. P., BAESSO, I., ALBIERO, M., SARTORE, S., AGOSTINI, C. & AVOGARO, A. 2008. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis*, 197, 496-503.
- FADINI, G. P., LOSORDO, D. & DIMMELER, S. 2012. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circulation research*, 110, 624-637.
- FORESTA, C., CARETTA, N., LANA, A., CABRELLE, A., PALU, G. & FERLIN, A. 2005. Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*, 17, 288-90.
- FOY, P. & MOLL, S. 2009. Thrombophilia: 2009 update. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 11, 114-28.
- FROSST, P., BLOM, H. J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C. A., MATTHEWS, R. G., BOERS, G. J., DEN HEIJER, M., KLUIJTMANS, L. A., VAN DEN HEUVEL, L. P. & ET AL. 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 10, 111-3.
- GABAY, C. & KUSHNER, I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 340, 448-54.
- GARCIA-RIBES, M., GONZALEZ-LAMUNO, D., HERNANDEZ-ESTEFANIA, R., COLMAN, T., POCOVI, M., DELGADO-RODRIGUEZ, M., GARCIA-FUENTES, M. & REVUELTA, J. M. 1998. Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb Haemost*, 79, 1126-9.
- GAWAZ, M., NEUMANN, F. J. & SCHOMIG, A. 1999. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation*, 99, E1-E11.
- GEORGE, F., BRISSON, C., PONCELET, P., LAURENT, J., MASSOT, O., ARNOUX, D., AMBROSI, P., KLEIN-SOYER, C., CAZENAVE, J. P. & SAMPOL, J. 1992. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thrombosis haemostasis* 67, 147-153.
- GEORGE, F., BROUQUI, P., BOFFA, M. C., MUTIN, M., DRANCOURT, M., BRISSON, C., RAOULT, D. & SAMPOL, J. 1993. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood*, 82, 2109-16.
- GEORGE, J., GOLDSTEIN, E., ABASHIDZE, S., DEUTSCH, V., SHMILOVICH, H., FINKELSTEIN, A., HERZ, I., MILLER, H. & KEREN, G. 2004. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J*, 25, 1003-8.
- GOMEZ-PUERTA, J. A. & CERVERA, R. 2014. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*, 48-49, 20-5.
- GONZALEZ-CONEJERO, R., LOZANO, M. L., RIVERA, J., CORRAL, J., INIESTA, J. A., MORALEDA, J. M. & VICENTE, V. 1998. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood*, 92, 2771-6.
- GOON, P. K., BOOS, C. J. & LIP, G. Y. 2005. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. *Clin Lab*, 51, 531-8.
- GREAVES, M. 1999. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet*, 353, 1348-53.

- GROSJEAN, J., KIRIAKIDIS, S., REILLY, K., FELDMANN, M. & PALEOLOG, E. 2006. Vascular endothelial growth factor signalling in endothelial cell survival: a role for NFκB. *Biochemical and biophysical research communications*, 340, 984-994.
- HILL, J. M., ZALOS, G., HALCOX, J. P., SCHENKE, W. H., WACLAWIW, M. A., QUYYUMI, A. A. & FINKEL, T. 2003. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, 348, 593-600.
- HIRMEROVÁ, J., KARETOVÁ, D., MALÝ, R., MUSIL, D. & ROZTOČIL, K. 2014. Akutní žilní trombóza 2014: Současný stav, prevence, diagnostiky a léčby: Doporučený postup české angiologické společnosti ČLS JEP. Česká společnost pro trombózu a hemostázu ČLS JEP [online]. 2014; 1 (1): 1-68 [cit. 2018-01-30].
- HLADOVEC, J., JIRKA, J., PREROVSKÝ, I. & MALEK, P. 1976. Decrease of endothelaemia during immunosuppression. *Biomedicine/[publiee pour l'AAICIG]*, 25, 204-206.
- HLADOVEC, J. & PREROVSKÝ, I. 1989. Endothelial lesion in hypertension. *Cor et vasa*, 31, 51-54.
- HLADOVEC, J., PŘEROVSKÝ, I., STANĚK, V. & FABIAN, J. 1978. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klinische Wochenschrift*, 56, 1033-1036.
- HLADOVEC, J. & ROSSMANN, P. 1973. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thrombosis research*, 3, 665-674.
- HLADOVEC, J., SOMMEROVÁ, Z. & PÍSAŘÍKOVÁ, A. 1997. Homocysteinemia and endothelial damage after methionine load. *Thrombosis research*, 88, 361-364.
- HO, J. W., PANG, R. W., LAU, C., SUN, C. K., YU, W. C., FAN, S. T. & POON, R. T. 2006. Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 44, 836-43.
- HOYMANS, V. Y., VAN CRAENENBROECK, A. H., BRUYNDONCKX, L., VAN IERSSEL, S. H., VRINTS, C. J., CONRAADS, V. M. & VAN CRAENENBROECK, E. M. 2012. TransFix(R) for delayed flow cytometry of endothelial progenitor cells and angiogenic T cells. *Microvasc Res*, 84, 384-6.
- HUIZER, K., MUSTAFA, D. A. M., SPELT, J. C., KROS, J. M. & SACCHETTI, A. 2017. Improving the characterization of endothelial progenitor cell subsets by an optimized FACS protocol. *PLoS One*, 12, e0184895.
- HUR, J., YOON, C.-H., KIM, H.-S., CHOI, J.-H., KANG, H.-J., HWANG, K.-K., OH, B.-H., LEE, M.-M. & PARK, Y.-B. 2004. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24, 288-293.
- CHIASAKUL, T., DE JESUS, E., TONG, J., CHEN, Y., CROWTHER, M., GARCIA, D., CHAI-ADISAKSOPHA, C., MESSE, S. R. & CUKER, A. 2019. Inherited Thrombophilia and the Risk of Arterial Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*, 8, e012877.
- CHONG, A. Y., LIP, G. Y., FREESTONE, B. & BLANN, A. D. 2006. Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: Comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin. *European journal of heart failure*, 8, 167-172.
- CHOPRA, H., HUNG, M., KWONG, D., ZHANG, C. & POW, E. 2018. Insights into endothelial progenitor cells: origin, classification, potentials, and prospects. *Stem cells international*, 2018.
- IMANISHI, T., HANO, T., MATSUO, Y. & NISHIO, I. 2003. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30, 665-70.
- INGRAM, D. A., MEAD, L. E., TANAKA, H., MEADE, V., FENOGLIO, A., MORTELL, K., POLLOK, K., FERKOWICZ, M. J., GILLEY, D. & YODER, M. C. 2004. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 104, 2752-2760.
- JACKSON, S. P. 2011. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*, 17, 1423-36.

- JAMSA, J., HUOTARI, V., SAVOLAINEN, E. R., SYRJALA, H. & ALA-KOKKO, T. 2011. Analysis of the temperature affects on leukocyte surface antigen expression. *J Clin Lab Anal*, 25, 118-25.
- JANSSENS, D., MICHIELS, C., GUILLAUME, G., CUISINIER, B., LOUAGIE, Y. & REMACLE, J. 1999. Increase in circulating endothelial cells in patients with primary chronic venous insufficiency: protective effect of Ginkor Fort in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 33, 7-11.
- KALINA, T., FLORES-MONTERO, J., VAN DER VELDEN, V. H., MARTIN-AYUSO, M., BOTTCHER, S., RITGEN, M., ALMEIDA, J., LHERMITTE, L., ASNAFI, V., MENDONCA, A., DE TUTE, R., CULLEN, M., SEDEK, L., VIDRIALES, M. B., PEREZ, J. J., TE MARVELDE, J. G., MEJSTRIKOVA, E., HRUSAK, O., SZCZEPANSKI, T., VAN DONGEN, J. J., ORFAO, A. & EUROFLOW, C. 2012. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26, 1986-2010.
- KAS-DEELEN, A. M., HARMSSEN, M. C., DE MAAR, E. F., OOST-KORT, W. W., TERVAERT, J. W. C., VAN DER MEER, J., VAN SON, W. J. & THE, T. H. 2000. Acute rejection before cytomegalovirus infection enhances von Willebrand factor and soluble VCAM-1 in blood. *Kidney international*, 58, 2533-2542.
- KHAN, S. S., SOLOMON, M. A. & MCCOY, J. P., JR. 2005. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 64, 1-8.
- KONDO, T., HAYASHI, M., TAKESHITA, K., NUMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, K., IINO, S., INDEN, Y. & MUROHARA, T. 2004. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1442-7.
- KRAAN, J., STRIJBOS, M. H., SIEUWERTS, A. M., FOEKENS, J. A., DEN BAKKER, M. A., VERHOEF, C., SLEIJFER, S. & GRATAMA, J. W. 2012. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients. *J Thromb Haemost*, 10, 931-9.
- KVASNICKA, T., HAJKOVA, J., BOBČIKOVA, P., CVERHOVA, V., MALIKOVA, I., ULRYCH, J., BRIZA, J., DUSKOVA, D., POLETINOVA, S., KIEFEROVA, V. & KVASNICKA, J. 2014. The frequencies of six important thrombophilic mutations in a population of the Czech Republic. *Physiol Res*, 63, 245-53.
- KVASNICKA, J. 2003a. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*, Praha, Grada Publishing a.s.
- KVASNICKA, J. 2003b. Žilní a tepenná trombofilie. *Interv. Akut. Kardiol*, 2, 23-29.
- KVASNICKA, J. 2010. Dědičné trombofilie – doporučení k provádění genetických testů v klinické praxi. *Časopis lékařů českých*, 149, 424-427.
- KVASNICKA, T. 2012. Tromboembolizmus, hemokoagulace a aterotrombóza. *Intervenční a akutní kardiologie*, 11, 15-17.
- KYRLE, P. A., MINAR, E., HIRSCHL, M., BIALONCZYK, C., STAIN, M., SCHNEIDER, B., WELTERMANN, A., SPEISER, W., LECHNER, K. & EICHINGER, S. 2000. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med*, 343, 457-62.
- LANUTI, P., ROTTA, G., ALMICI, C., AVVISATI, G., BUDILLON, A., DORETTO, P., MALARA, N., MARINI, M., NEVA, A., SIMEONE, P., DI GENNARO, E., LEONE, A., FALDA, A., TOZZOLI, R., GREGORJ, C., DI CERBO, M., TRUNZO, V., MOLLACE, V., MARCHISIO, M. & MISCIA, S. 2016. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytometry A*, 89, 259-70.
- LEFEVRE, P., GEORGE, F., DURAND, J. & SAMPOL, J. 1993. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thrombosis and haemostasis*, 69, 522-522.

- LEV, E. I., ESTROV, Z., ABOULFATOVA, K., HARRIS, D., GRANADA, J. F., ALVIAR, C., KLEIMAN, N. S. & DONG, J. F. 2006. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*, 96, 498-504.
- LI, W. D. & LI, X. Q. 2016. Endothelial progenitor cells accelerate the resolution of deep vein thrombosis. *Vascul Pharmacol*, 83, 10-6.
- LIN, Y., WEISDORF, D. J., SOLOVEY, A. & HEBBEL, R. P. 2000. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation*, 105, 71-77.
- MACENEANEY, O. J., DESOUZA, C. A., WEIL, B. R., KUSHNER, E. J., VAN GUILDER, G. P., MESTEK, M. L., GREINER, J. J. & STAUFFER, B. L. 2011. Prehypertension and endothelial progenitor cell function. *J Hum Hypertens*, 25, 57-62.
- MAKIN, A. J., BLANN, A. D., CHUNG, N. A., SILVERMAN, S. H. & LIP, G. Y. 2004. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells: relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *European heart journal*, 25, 371-376.
- MANCUSO, P., ANTONIOTTI, P., QUARNA, J., CALLERI, A., RABASCIO, C., TACCHETTI, C., BRAIDOTTI, P., WU, H. K., ZURITA, A. J., SARONNI, L., CHENG, J. B., SHALINSKY, D. R., HEYMACH, J. V. & BERTOLINI, F. 2009. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res*, 15, 267-73.
- MANCUSO, P., BURLINI, A., PRUNERI, G., GOLDBIRSCH, A., MARTINELLI, G. & BERTOLINI, F. 2001. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*, 97, 3658-61.
- MARGAGLIONE, M. & GRANDONE, E. 2011. Population genetics of venous thromboembolism. A narrative review. *Thromb Haemost*, 105, 221-31.
- MARCHI, R., LUNDBERG, U., GRIMBERGEN, J., KOOPMAN, J., TORRES, A., DE BOSCH, N. B., HAVERKATE, F. & AROCHA PINANGO, C. L. 2000. Fibrinogen Caracas V, an abnormal fibrinogen with an Aalpha 532 Ser-->Cys substitution associated with thrombosis. *Thromb Haemost*, 84, 263-70.
- MARINOV, I. 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*, Praha, Triton.
- MASOULEH, B. K., BARANISKIN, A., SCHMIEGEL, W. & SCHROERS, R. 2010. Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol. *J Immunol Methods*, 357, 38-42.
- MASSA, M., ROSTI, V., FERRARIO, M., CAMPANELLI, R., RAMAJOLI, I., ROSSO, R., DE FERRARI, G. M., FERLINI, M., GOFFREDO, L., BERTOLETTI, A., KLERSY, C., PECCI, A., MORATTI, R. & TAVAZZI, L. 2005. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*, 105, 199-206.
- MEIJERS, J. C., TEKELBURG, W. L., BOUMA, B. N., BERTINA, R. M. & ROSENDAAL, F. R. 2000. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*, 342, 696-701.
- MITCHELL, A., FUJISAWA, T., MILLS, N. L., BRITTAN, M., NEWBY, D. E. & CRUDEN, N. L. M. 2017. Endothelial Progenitor Cell Biology and Vascular Recovery Following Transradial Cardiac Catheterization. *J Am Heart Assoc*, 6.
- MOBIUS-WINKLER, S., HOLLRIEGEL, R., SCHULER, G. & ADAMS, V. 2009. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease. *Cytometry A*, 75, 25-37.
- MOSHFEGH, K., WUILLEMIN, W. A., REDONDO, M., LAMMLE, B., BEER, J. H., LIECHTI-GALLATI, S. & MEYER, B. J. 1999. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet*, 353, 351-4.
- MOTOVSKA, Z., KVASNICKA, J., WIDIMSKY, P., PETR, R., HAJKOVA, J., BOBČIKOVA, P., OSMANCIK, P., ODVODYOVA, D. & KATINA, S. 2010. Platelet glycoprotein GP VI 13254C allele is an independent risk factor of premature myocardial infarction. *Thromb Res*, 125, e61-4.

- MUND, J. A. & CASE, J. 2011. The ontogeny of endothelial progenitor cells through flow cytometry. *Current opinion in hematology*, 18, 166-170.
- MUTIN, M., CANAVY, I., BLANN, A., BORY, M., SAMPOL, J. & DIGNAT-GEORGE, F. 1999. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 93, 2951-8.
- MUTUNGA, M., FULTON, B., BULLOCK, R., BATCHELOR, A., GASCOIGNE, A., GILLESPIE, J. I. & BAUDOUIN, S. V. 2001. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 195-200.
- NADAR, S. K., LIP, G. Y., LEE, K. W. & BLANN, A. D. 2005. Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thrombosis and haemostasis*, 94, 707-712.
- NAKATANI, K., TAKESHITA, S., TSUJIMOTO, H., KAWAMURA, Y., TOKUTOMI, T. & SEKINE, I. 2003. Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 131, 536-540.
- OBEID, J., NGUYEN, T., CELLUCCI, T., LARCHE, M. J. & TIMMONS, B. W. 2015. Effects of acute exercise on circulating endothelial and progenitor cells in children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis and healthy controls: a pilot study. *Pediatr Rheumatol Online J*, 13, 41.
- OGUEY, D., GEORGE, P. W. & RÜEGG, C. 2000. Disruption of integrin-dependent adhesion and survival of endothelial cells by recombinant adenovirus expressing isolated β integrin cytoplasmic domains. *Gene therapy*, 7, 1292-1303.
- OLLIKAINEN, E., MIKKELSSON, J., PEROLA, M., PENTTILA, A. & KARHUNEN, P. J. 2004. Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis*, 176, 95-9.
- PEICHEV, M., NAIYER, A. J., PEREIRA, D., ZHU, Z., LANE, W. J., WILLIAMS, M., OZ, M. C., HICKLIN, D. J., WITTE, L., MOORE, M. A. & RAFII, S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95, 952-8.
- PERCIVALLE, E., REVELLO, M. G., VAGO, L., MORINI, F. & GERNA, G. 1993. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest*, 92, 663-70.
- POORT, S. R., ROSENDAAL, F. R., REITSMA, P. H. & BERTINA, R. M. 1996. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 88, 3698-703.
- POPA, E. R., KAS-DEELEN, A. M., HEPKEMA, B. G., VAN SON, W. J. & HARMSSEN, M. C. 2002. Donor-derived circulating endothelial cells after kidney transplantation. *Transplantation*, 74, 1320-1327.
- POUL, H. 2006. Trombofilní stavy významné v patogenezi žilní tromboembolické nemoci. *Vnitřní lékařství*, 12, 17-25.
- PRESTON, R. A., LEDFORD, M., MATERSON, B. J., BALTODANO, N. M., MEMON, A. & ALONSO, A. 2002. Effects of severe, uncontrolled hypertension on endothelial activation: soluble vascular cell adhesion molecule-1, soluble intercellular adhesion molecule-1 and von Willebrand factor. *Journal of hypertension*, 20, 871-877.
- PŘEROVSKÝ, I. & HLADOVEC, J. 1979. Suppression of the desquamating effect of smoking on the human endothelium by hydroxyethylrutosides. *Journal of Vascular Research*, 16, 239-240.
- RABINOVICH, A., COHEN, J. M., PRANDONI, P. & KAHN, S. R. 2014. Association between thrombophilia and the post-thrombotic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*, 12, 14-23.
- RAJAGOPALAN, S., SOMERS, E. C., BROOK, R. D., KEHRER, C., PFENNINGER, D., LEWIS, E., CHAKRABARTI, A., RICHARDSON, B. C., SHELDEN, E. & MCCUNE, W. J. 2004. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood*, 103, 3677-3683.

- RAWSTRON, A. C., BOTTCHEER, S., LETESTU, R., VILLAMOR, N., FAZI, C., KARTSIOS, H., DE TUTE, R. M., SHINGLES, J., RITGEN, M., MORENO, C., LIN, K., PETTITT, A. R., KNEBA, M., MONTSERRAT, E., CYMBALISTA, F., HALLEK, M., HILLMEN, P., GHIA, P. & EUROPEAN RESEARCH INITIATIVE IN, C. L. L. 2013. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia*, 27, 142-9.
- REHMAN, J., LI, J., PARVATHANENI, L., KARLSSON, G., PANCHAL, V. R., TEMM, C. J., MAHENTHIRAN, J. & MARCH, K. L. 2004. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol*, 43, 2314-8.
- RHONE, P., RUSZKOWSKA-CIASTEK, B., CELMER, M., BRKIC, A., BIELAWSKI, K., BOINSKA, J., ZARYCHTA, E. & ROSC, D. 2017. Increased number of endothelial progenitors in peripheral blood as a possible early marker of tumour growth in post-menopausal breast cancer patients. *J Physiol Pharmacol*, 68, 139-148.
- RIBA, R., SHARIFI, M., FARNDAL, R. W. & NASEEM, K. M. 2005. Regulation of platelet guanylyl cyclase by collagen: evidence that Glycoprotein VI mediates platelet nitric oxide synthesis in response to collagen. *Thromb Haemost*, 94, 395-403.
- RÜEGG, C., DORMOND, O. & FOLETTI, A. 2002. Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium*, 9, 151-160.
- RUGGERI, Z. M. 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8, 1227-34.
- SARTORI, M. T., DANESIN, C., SAGGIORATO, G., TORMENE, D., SIMIONI, P., SPIEZIA, L., PATRASSI, G. M. & GIROLAMI, A. 2003. The PAI-I gene 4G/5G Polymorphism and Deep Vein Thrombosis in Patients with Inherited Thrombophilia. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 9, 299-307.
- SBARBATI, R., DE BOER, M., MARZILLI, M., SCARLATTINI, M., ROSSI, G. & VAN MOURIK, J. A. 1991. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood*, 77, 764-9.
- SCHMIDT-LUCKE, C., FICHTLSCHERER, S., AICHER, A., TSCHÖPE, C., SCHULTHEISS, H.-P., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2010. Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PloS one*, 5, e13790.
- SINZINGER, H., VIRGOLINI, I., FITSCHA, P., RAUSCHA, F. & KALIMAN, J. 1988. Stabilization of endothelial lining and decrease in circulating endothelial cells--one mechanism underlying the clinical action of PGE1? *British journal of clinical pharmacology*, 25, 775.
- SOLOVEY, A., LIN, Y., BROWNE, P., CHOONG, S., WAYNER, E. & HEBBEL, R. P. 1997. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*, 337, 1584-90.
- STEURER, M., KERN, J., ZITT, M., AMBERGER, A., BAUER, M., GASTL, G., UNTERGASSER, G. & GUNSILIUS, E. 2008. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC Res Notes*, 1, 71.
- TARUMI, T., MARTINCIC, D., THOMAS, A., JANCO, R., HUDSON, M., BAXTER, P. & GAILANI, D. 2000. Familial thrombophilia associated with fibrinogen parisi V: Dusart syndrome. *Blood*, 96, 1191-3.
- TEOFILI, L., MARTINI, M., IACHININOTO, M. G., CAPODIMONTI, S., NUZZOLO, E. R., TORTI, L., CENCI, T., LAROCCA, L. M. & LEONE, G. 2011. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2(V617F) mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 117, 2700-7.
- TEPPER, O. M., GALIANO, R. D., CAPLA, J. M., KALKA, C., GAGNE, P. J., JACOBOWITZ, G. R., LEVINE, J. P. & GURTNER, G. C. 2002. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 106, 2781-2786.
- TIMMERMANS, F., VAN HAUWERMEIREN, F., DE SMEDT, M., RAEDT, R., PLASSCHAERT, F., DE BUYZERE, M. L., GILLEBERT, T. C., PLUM, J. &

- VANDEKERCKHOVE, B. 2007. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27, 1572-1579.
- TUNG, J. W., PARKS, D. R., MOORE, W. A., HERZENBERG, L. A. & HERZENBERG, L. A. 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol*, 110, 277-83.
- TYBJAERG-HANSEN, A., AGERHOLM-LARSEN, B., HUMPHRIES, S. E., ABILDGAARD, S., SCHNOHR, P. & NORDESTGAARD, B. G. 1997. A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *The Journal of Clinical Investigation*, 99, 3034-3039.
- VAN AKEN, B. E., DEN HEIJER, M., BOS, G. M., VAN DEVENTER, S. J. & REITSMA, P. H. 2000. Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost*, 83, 536-9.
- VAN CRAENENBROECK, E. M., CONRAADS, V. M., VAN BOCKSTAELE, D. R., HAINE, S. E., VERMEULEN, K., VAN TENDELOO, V. F., VRINTS, C. J. & HOYMANS, V. Y. 2008. Quantification of circulating endothelial progenitor cells: a methodological comparison of six flow cytometric approaches. *J Immunol Methods*, 332, 31-40.
- VAN CRAENENBROECK, E. M., VAN CRAENENBROECK, A. H., VAN IERSSEL, S., BRUYNDONCKX, L., HOYMANS, V. Y., VRINTS, C. J. & CONRAADS, V. M. 2013. Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int J Cardiol*, 167, 1688-95.
- VAN HYLCKAMA VLIEG, A., VAN DER LINDEN, I. K., BERTINA, R. M. & ROSENDAAL, F. R. 2000. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood*, 95, 3678-82.
- VARGA-SZABO, D., PLEINES, I. & NIESWANDT, B. 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 403-12.
- WANG, X., ZHU, J., CHEN, J. & SHANG, Y. 2004. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *J Clin Pharmacol*, 44, 881-9.
- WEITZ, J. I., MIDDELDORP, S., GEERTS, W. & HEIT, J. A. 2004. Thrombophilia and new anticoagulant drugs. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 424-38.
- WERNER, N., KOSIOL, S., SCHIEGL, T., AHLERS, P., WALENTA, K., LINK, A., BOHM, M. & NICKENIG, G. 2005. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353, 999-1007.
- WOGNUM, A. W., EAVES, A. C. & THOMAS, T. E. 2003. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*, 34, 461-75.
- WOYWODT, A., BAHLMANN, F. H., DE GROOT, K., HALLER, H. & HAUBITZ, M. 2002. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17, 1728-1730.
- WOYWODT, A., HAUBITZ, M., BUCHHOLZ, S. & HERTENSTEIN, B. 2004a. Counting the cost: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation*, 34, 1015-1023.
- WOYWODT, A., SCHEER, J., HAMBACH, L., BUCHHOLZ, S., GANSER, A., HALLER, H., HERTENSTEIN, B. & HAUBITZ, M. 2004b. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 103, 3603-5.
- WOYWODT, A., STREIBER, F., DE GROOT, K., REGELSBERGER, H., HALLER, H. & HAUBITZ, M. 2003. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *The Lancet*, 361, 206-210.
- WRIGHT, H. P. & GIACOMETTI, N. 1972. Circulating endothelial cells and arterial endothelial mitosis in anaphylactic shock. *British journal of experimental pathology*, 53, 1.
- YAU, J. W., TEOH, H. & VERMA, S. 2015. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord*, 15, 130.

- YIP, H. K., CHANG, L. T., CHANG, W. N., LU, C. H., LIOU, C. W., LAN, M. Y., LIU, J. S., YOUSSEF, A. A. & CHANG, H. W. 2008. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke*, 39, 69-74.
- YU, P., GE, Y. Z., ZHAO, Y., WU, J. P., WU, R., ZHOU, L. H. & JIA, R. P. 2014. Identification and significance of mobilized endothelial progenitor cells in tumor neovascularization of renal cell carcinoma. *Tumour Biol*, 35, 9331-41.
- ZAHARAN, A. M., ALY, S. S., ALTAYEB, H. A. & ALI, A. M. 2016. Circulating endothelial cells and their progenitors in acute myeloid leukemia. *Oncology letters*, 12, 1965-1970.
- ZHANG, H., VAKIL, V., BRAUNSTEIN, M., SMITH, E. L., MARONEY, J., CHEN, L., DAI, K., BERENSON, J. R., HUSSAIN, M. M., KLUEPPELBERG, U., NORIN, A. J., AKMAN, H. O., OZCELIK, T. & BATUMAN, O. A. 2005. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*, 105, 3286-94.

10. Seznam příloh

V přílohách jsou uvedeny původní publikace s impakt faktorem.

Příloha č. 1:

Řádek M, Babuňková E, Špaček M, Kvasnička T, Kvasnička J. Determination of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells Using Multicolor Flow Cytometry in Patients with Thrombophilia. *Acta Haematologica*. 2019;142(2):113-119. doi: 10.1159/000499524. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30995655. [Journal IF 2020 = 2,195]

Příloha č. 2:

Karolová J, Řádek M, Helman K, Špaček M, Trněný M, Klener P. PD-1, PD-L1 and PD-L2 Expression in Mantle Cell Lymphoma and Healthy Population. *Folia Biologica (Praha)*. 2020;66(4):117-122. PMID: 33745258. [Journal IF 2020 = 0,906]