

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta

**Stanovení exprese markerů aktivace krevních destiček v patofyziologii  
trombotických stavů**

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

**Mgr. Martin Řádek**

2021

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Školící pracoviště: Centrální hematologické laboratoře, Trombotické centrum, ÚLBLD  
VFN a 1. LF UK v Praze, U Nemocnice 499/2, 128 08 Praha 2

Školitel: doc. MUDr. Tomáš Kvasnička, CSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## 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**

1. Úvod	6
2. Vědecká hypotéza a cíle práce	8
2.1. Vědecká hypotéza	8
2.2. Cíle práce	8
3. Materiál a metody	9
3.1. Soubor pacientů a kontrolních skupin	9
3.2. Odběr biologického materiálu	9
3.3. Analýza krevního obrazu	9
3.4. Analýza na průtokovém cytometru	9
3.5. Výpočet absolutního zastoupení subpopulací endotelových buněk v cirkulaci	10
3.6. Statistická analýza	10
4. Výsledky	11
4.1. Stanovení imunofenotypu endotelových buněčných subpopulací	11
4.2. Stanovení referenčních hodnot CEC a EPC	13
4.3. Stanovení hodnot CEC a EPC u pacientů s vrozenou trombofilií	14
4.4. Stanovení hodnot CEC a EPC u pacientů s akutní trombózou	15
4.5. Stanovení hodnot CEC a EPC u skupiny kontrolních pacientů	15
5. Diskuze	16
6. Souhrn závěrů	20
7. Seznam použité literatury	21
8. Seznam publikací	24
8.1. Publikace jako podklad dizertace	24
8.2. Publikace bez vztahu k dizertaci	24

## 1. Úvod

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. 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, 2003). Vrozené trombofilie asociované především s žilní, ale v některých případech i s arteriální trombózou zahrnují zejména deficit antitrombinu, proteinu C nebo proteinu S, leidskou mutaci faktoru V (rezistence aktivovaného proteinu C) a mutaci G20210A 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). Prevalence mutace faktoru V Leiden a G20210A protrombinu, tj. dvou nejfrekventovanějších trombofilních mutací činí ve zdravé populaci v České republice 4,5 %, respektive 1,3 % (Kvasnička et al., 2014). Obecně je alespoň jednou identifikovatelnou trombofilní mutací postiženo více než 10 % celkové populace (Rabinovich et al., 2014). V patofyziologii trombotických stavů mají klíčovou roli krevní destičky ve vztahu s endotelem, který ztrácí své protitrombotické vlastnosti (Kvasnička, 2003). 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) (Erdbruegger et al., 2006) 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.

CEC představují zralé buňky uvolněné z cévního endotelu jako důsledek poškození cév (Kraan et al., 2012). Proto jsou tyto buňky považovány za markery endoteliálního poškození nebo dysfunkce (Boos et al., 2006, Kraan et al., 2012, Erdbruegger et al., 2006).

Navíc byla popsána korelace CEC s plazmatickými markery endoteliálního poškození (vWF a rozpustný E-selektin) (Blann et al., 2005). Zvýšené hladiny CEC byly prokázány u mnoha onemocněních, jako jsou infekce (George et al., 1993), poruchy imunity (Clancy et al., 2001), plicní arteriální hypertenze (Bull et al., 2003), posttransplantační stavy (Woywodt et al., 2004), nádorová onemocnění (Mancuso et al., 2001), kardiovaskulární onemocnění (Mutin et al., 1999) nebo hluboká žilní trombóza (Alessio et al., 2013). Naproti tomu fyziologickou funkcí EPC je udržení cévní integrity, regenerace a remodelace tkání (George et al., 2011, Asahara et al., 1999), a proto jsou považovány za markery obnovy endotelových buněk (Doyle et al., 2017, Chopra et al., 2018). Změny hladin EPC byly popsány při různých klinických stavech, například při akutním infarktu myokardu (Massa et al., 2005), diabetu mellitu (Tepper et al., 2002) nebo maligních onemocněních (Zhang et al., 2005, Zahran et al., 2016, Rhone et al., 2017, Yu et al., 2014). Zvýšený počet EPC je také spojen s dlouhodobým cvičením profesionálních běžců (Bittencourt et al., 2017). Změny v počtu EPC byly pozorovány i u pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním s trombotickými komplikacemi (Teofili et al., 2011).

Mnoho nemocí, včetně trombotických komplikací, jsou spojeny s cévním poškozením, proto je stanovení počtu CEC a EPC považováno za slibný nástroj pro sledování aktivity onemocnění s potenciálem ke zhodnocení prognózy a odpovědi na léčbu (Blann et al., 2005, Chopra et al., 2018, Erdbruegger et al., 2006). Avšak absence standardizovaných metod a použití odlišně definovaných imunofenotypů vedlo k široké variabilitě při kvantifikaci CEC a EPC (Kraan et al., 2012, Lanuti et al., 2016).

## **2. Vědecká hypotéza a cíle práce**

### **2.1. Vědecká hypotéza**

Změny v počtech CEC (markery poškození endotelu) a EPC (markery obnovy endotelu) kvantifikované pomocí standardizované metody vícebarevné průtokové cytometrie z periferní krve odráží aktivitu endotelu a krevních destiček v patofyziologii trombotických stavů u pacientů se známou trombofilií.

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 zase zvýšené počty CEC indikují vyšší riziko vzniku nebo rekurence trombózy. Naproti tomu EPC 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.



### **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 EPC a 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). 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 K<sub>3</sub>EDTA nebo K<sub>2</sub>EDTA jako antikoagulačního činidla. 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 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.

#### **3.4. Analýza na průtokovém cytometru**

Vícebarevná imunofenotypizační analýza byla provedena z plné krve pomocí průtokového cytometru FACSVerse (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).

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).

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.

### 3.5. Výpočet absolutního zastoupení subpopulací endotelových buněk v cirkulaci

Absolutní zastoupení CEC a EPC v periferní krvi bylo vypočteno na základě výsledků parametru WBC z krevního obrazu a zjištěných počtů buněk leukocytů, CEC a EPC 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 [ $10^9 \text{ l}^{-1}$ ] 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.

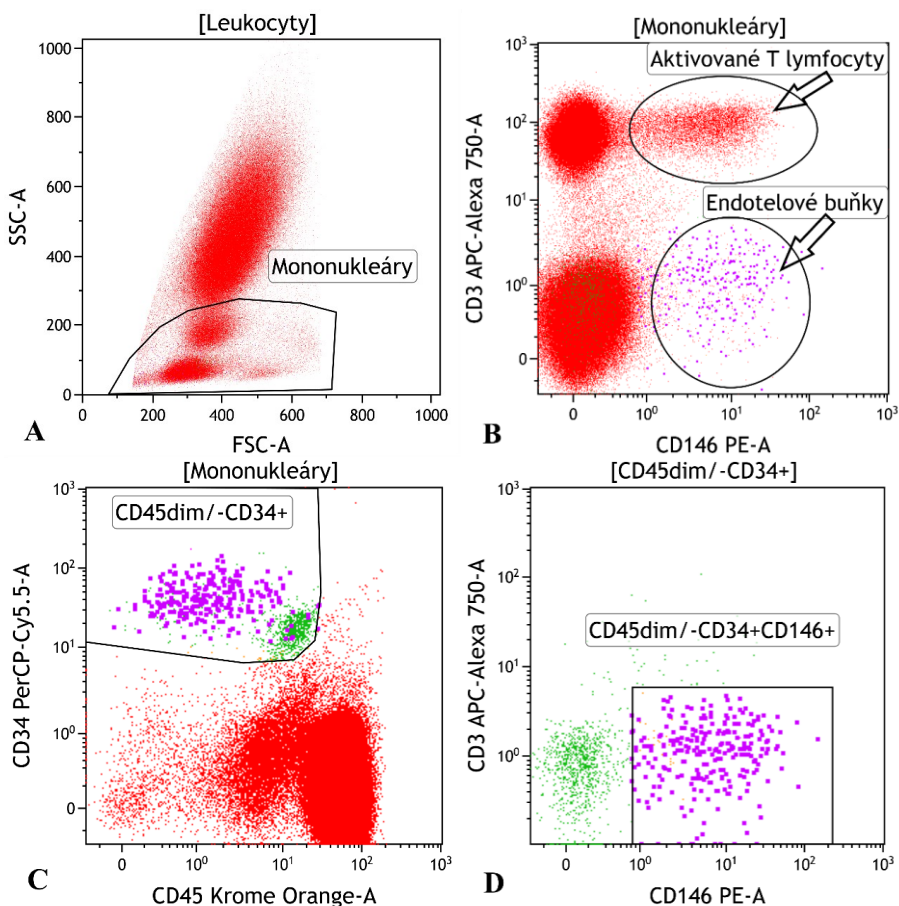
Jako detekovatelná byly považován každá buněčná populace, jejíž počet buněk byl vyšší než limit detekce metody (LoD), tj. minimálně 20 buněk v rámci jedné populace.

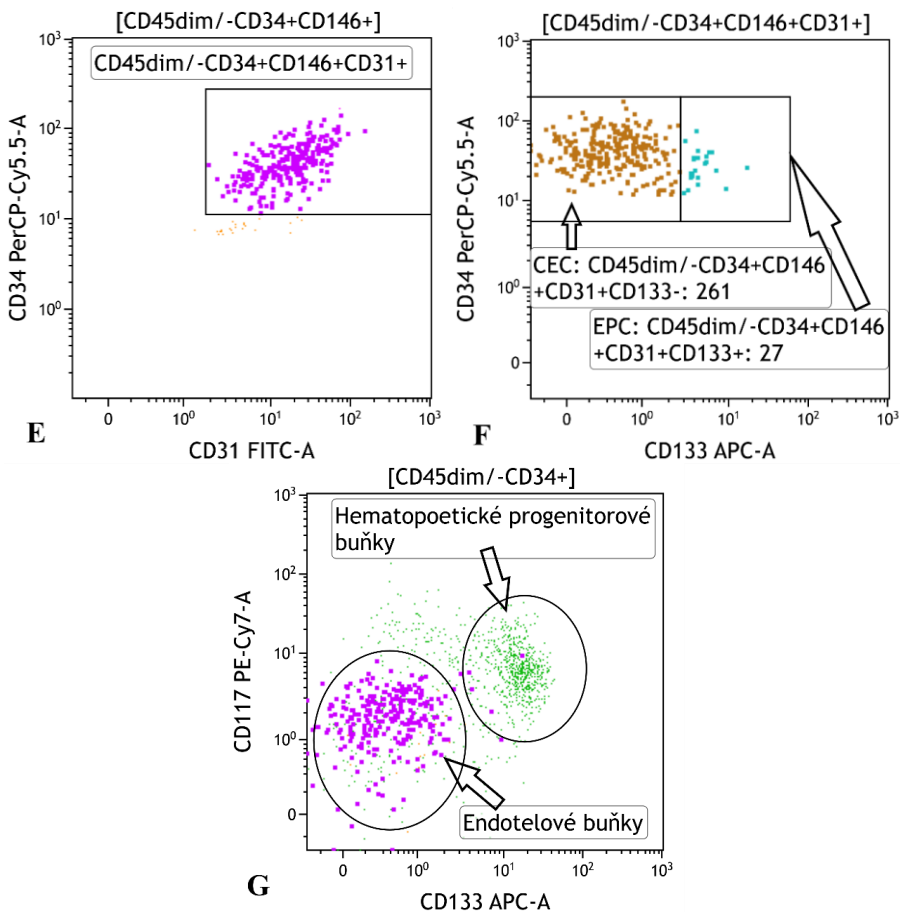
Na rozmezí výsledných hodnot absolutních počtů buněčných subpopulací CEC a EPC byl aplikován 90% interval spolehlivosti.

## 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.

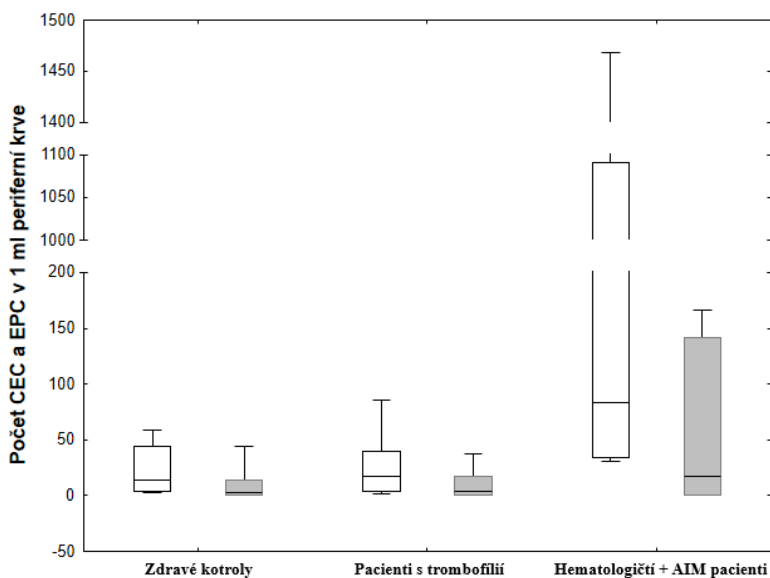
Skupina (počet)	Pacienti s trombofilií (n = 61)	Zdravé kontroly (n = 28)	Hematologičtí a AIM pacienti (n = 31)
Medián věku (rozmezí)	46 (25 – 82)	33 (18 – 64)	61 (19 – 81)
Pohlaví (žena:muž)	28:33	19:9	7:24
Počet pacientů s VTE anamnézou (%)	31 (50,8)	0 (0)	3 (9,7)
Počet pacientů s trombofilií (%)	61 (100)	0 (0)	1 (3,2)
- FV Leiden <sup>1</sup> (%)	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: <sup>1</sup> 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 vyznačené hodnoty mediánu, minima a maxima.

Vvšvřtlivkv: AIM. akutní infarkt mvokardu.

#### **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 trombofilii (viz tabulka 4.1). Zvýšené počty CEC, ale ne EPC, byly detekovány u dvou pacientů s akutním infarktem myokardu. Statistický 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

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., 2006), 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 přípravy byla jako výchozí materiál použita plná krev bez izolace mononukleárních buněk, 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.

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) (Duda et al., 2007, Steurer et al., 2008, Obeid et al., 2015). Avšak tento panel 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 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 byl ke stanovení příslušnosti buněk k endoteliální linii použit znak CD146 (S-endo), který byl exprimován i na subpopulaci aktivovaných T lymfocytů (viz obrázek 4.1 B), jejichž pozitivita umožňuje použití těchto buněk jako interní pozitivní kontroly pro detekci endotelových buněk.

V této práci byla k identifikaci CEC a EPC použita metoda vícebarevné průtokové cytometrie. Naš 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 bylo potřeba načtení ještě většího počtu buněk, tedy 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 plně 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 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 trombóz 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). To lze přičíst faktu, že odběry vzorků krve těchto pacientů byly prováděné v rámci dlouhodobé dispenzarizace, a tudíž ani pacienti s dřívější anamnézou žilní trombózy aktuálně nevykazovali známky zvýšené trombogeneze. 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 (Janssens et al., 1999, Mutin et al., 1999, Bull et al., 2003, George et al., 2004, Makin et al., 2004, Massa et al., 2005, Nadar et al., 2005, Bonello et al., 2006, Chong et al., 2006) a v posttransplantačních podmínkách (Popa et al., 2002, Woywodt et al., 2004).

## 6. 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.

## 7. 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., MASUDA, H., TAKAHASHI, T., KALKA, C., PASTORE, C., SILVER, M., KEARNE, M., MAGNER, M. & ISNER, J. M. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85, 221-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. 2006. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta*, 373, 17-26.
- 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.
- GEORGE, A. L., BANGALORE-PRAKASH, P., RAJORIA, S., SURIANO, R., SHANMUGAM, A., MITTELMAN, A. & TIWARI, R. K. 2011. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol*, 4, 24.
- 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.
- GOON, P. K., BOOS, C. J., STONELAKE, P. S., BLANN, A. D. & LIP, G. Y. 2006. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost*, 96, 45-52.
- 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.

- 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.
- 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., MENDONÇA, 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.
- 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, 1422-7.
- KRAAN, J., STRIJBOS, M. H., SIEUWERTS, A. M., FOKKENS, 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.
- KVASNICKÁ, J. 2003. *Trombofile a trombotické stavy v klinické praxi*. Praha, Grada Publishing a.s.
- 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.
- 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.
- 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., GOLDBIRSCHE, A., MARTINELLI, G. & BERTOLINI, F. 2001. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*, 97, 3658-61.
- 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.
- MITCHELL, A., FUJISAWA, T., MILLS, N. L., BRITAN, 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.
- 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.
- 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.
- 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. *Pediatric Rheumatol Online J*, 13, 41.
- 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. & RAFIL, S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95, 952-8.
- 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 I. *Transplantation*, 74, 1320-1327.
- 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.
- 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-CIASEK, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- WEITZ, J. I., MIDDELDORP, S., GEERTS, W. & HEIT, J. A. 2004. Thrombophilia and new anticoagulant drugs. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 424-38.
- 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., SCHEER, J., HAMBACH, L., BUCHHOLZ, S., GANSER, A., HALLER, H., HERTENSTEIN, B. & HAUBITZ, M. 2004. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 103, 3603-5.
- 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. & ALLI, 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.

## **8. Seznam publikací**

### **8.1. Publikace jako podklad dizertace**

- 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]
- 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]

### **8.2. Publikace bez vztahu k dizertaci**

- Řádek M a Koblížek M. Aerobní anoxygenní fototrofní bakterie. *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*, 2011, LII, s. 2-15. ISSN 0009-0646.