

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**HODNOCENÍ MOŘSKÉHO ALKALOIDU FASCAPLYSINU JAKO
POTENCIÁLNÍ ANTITROMBOTICKÁ LÁTKA**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Zuzana Kolářová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

V Hradci Králové dne 14.5.2024

Zuzana Kolářová

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Alexandru Carazovi, Ph.D. za cenné rady, odborné konzultace, trpělivost a ochotu během vedení mé diplomové práce. Poděkování patří také dárcům krve za spolupráci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Zuzana Kolářová

Školitel: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení mořského alkaloidu fascaplysinu jako potenciální antitrombotická látka

Fascaplysin, pentacyklický indolový alkaloid izolovaný z mořské houby *Fascaplysinopsis bergquist* sp., patří mezi látky mořského původu, kterým je věnována stále větší pozornost a u kterých došlo k významným pokrokům. U fascaplysinu jsou zkoumány mimo jiné antineoplastické vlastnosti, kde fascaplysin prokazuje slibné biologické účinky jako inhibitor kináz.

V této práci byly analyzovány potenciální antitrombotické vlastnosti této látky, jež nebyly doposud dostatečně prozkoumány. K tomuto účelu byla použita plazma od 10 zdravých dárců. Agregační experimenty byly provedené na optickém agregometru s využitím plazmy bohaté na trombocyty připravené z plné krve. K indukci agregace byl použit kolagen nebo kyselina arachidonová (AK) s nebo bez předchozí inkubace s fascaplysinem v různých koncentracích. Fascaplysin významně inhiboval agregaci trombocytů u obou testovaných činidel. U indukce kolagenem došlo k inhibici při výrazně nižší koncentraci než u AK. Fascaplysin také nebyl toxický na trombocyty. Dále byl hodnocen účinek fascaplysinu na koagulaci pomocí aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT), protrombinového času (PT) a trombinového času (TT). Žádné významné změny v koagulačních drahách nebyly pozorovány, přestože byl fascaplysin schopný inhibovat aktivitu trombinu a faktoru Xa ve specifickém *in vitro* enzymatickém testu.

Fascaplysin je zajímavá biologicky aktivní molekula se slibnými protidestičkovými vlastnostmi. Doplnující studie by měly určit potenciální aplikace látky pro klinickou praxi, jelikož tyto informace stále chybí.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Zuzana Kolářová

Supervisor: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Evaluation of marine alkaloid fascaplysin as a potential antithrombotic agent

Fascaplysin, a pentacyclic indole alkaloid isolated from marine sponge *Fascaplysinopsis bergquist* sp., is one of the agents of marine origin that is receiving increasing attention and for which significant advances have been made. Fascaplysin is being investigated for, among other things, antineoplastic properties, where fascaplysin shows promising biological effect as a kinase inhibitor.

In this study, the potential antithrombotic properties of this substance, which have not yet been sufficiently investigated, were analysed. For this purpose, plasma from 10 healthy donors was used. Aggregation experiments were performed on an optical aggregometer using platelet-rich plasma prepared from blood. Collagen or arachidonic acid (AK) was used to induce aggregation with or without a pre-incubation with fascaplysin at various concentration ranges. Fascaplysin significantly inhibited platelet aggregation for both agents tested. Collagen induction was inhibited at a significantly lower concentration than AK. Fascaplysin also was not toxic to platelets. Moreover, the effect of fascaplysin on coagulation was evaluated using activated partial time of thromboplastin (aPTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT). No significant changes in coagulation pathways were observed, although fascaplysin was able to inhibit the activity of both thrombin and factor Xa in specific *in vitro* enzymatic assay.

Fascaplysin is an interesting biologically active molecule with promising antiplatelet properties. Additional studies should determine the potential application of the agent for clinical practice, as this information is still lacking.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	Adenosindifosfát
AChE	Acetylcholinesteráza
AK	Arachidonová kyselina
aPTT	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ASA	Kyselina acetylsalicylová
AT III	Antitrombin III
ATP	Adenosintrifosfát
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CDK 4,6	Cyklin-dependentní kináza 4,6
COCl ₂	Oxalychlorid
COX	Cyklooxygenáza
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOACs	Direct oral anticoagulants, přímá perorální antikoagulancia
EPCR	Endotelový protein C receptor
F	Faktor
GAG	Glukosaminoglykan
GP	Glykoprotein
HMWK	High-molecular-weight kininogen, vysokomolekulární kininogen
HŽT	Hluboká žilní trombóza
iCMP	Ischemická cévní mozková příhoda
ICHs	Ischemická choroba srdeční

IM	Infarkt myokardu
INR	International normalized ratio
IP3	Inositoltrifosfát
ISI	International sensitivity index
NaH	Indolyl sodný
NO	Oxid dusnatý
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs, nesteroidní antiflogistika
PAI-1	Inhibitor aktivátoru plazminu
PAR-1-AP	Peptid aktivující proteázu aktivovaného receptoru-1
PC	Protein C
Pd/C	Palladium na uhlíku
PDE-3	Fosfodiesteráza 3
PGI2	Prostaglandin I2, prostacyklin
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kináza
PK	Prekalikrein
PMA	Forbol-12-myristát 13-acetát
PPI	Inhibitor protonové pumpy
PPP	Platelet-poor plasma, plazma chudá na trombocyty
PRP	Platelet-rich plasma, plazma bohatá na trombocyty
PT	Protrombinový čas
Rpm	Revolutions per minute, otáčky za minutu
SDS	Sodium dodecyl sulphate, dodecylsírán sodný
SSRI	Inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
TAFI	Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy

TEN	Tromboembolická nemoc
TF	Tkáňový faktor
TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TM	Trombomodulin
TP	Tromboxanový receptor
t-PA	Tkáňový aktivátor plazminogenu
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TT	Trombinový čas
TXA2	Tromboxan A2
u-PA	Urokináza
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
vWF	Von Willebrandův faktor
WST	Water Soluble Tetrazolium, ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl
α_2 AP	α_2 – antiplazmin

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část	3
2.1	Fascaplysin	3
2.1.1	Účinky	3
2.1.2	Syntéza	5
2.2	Hemostáza	7
2.2.1	Primární hemostáza	8
2.2.2	Sekundární hemostáza	10
2.2.3	Fibrinolýza.....	13
2.2.4	Regulace hemostázy.....	14
2.3	Vyšetření hemostázy	15
2.3.1	Screeningové testy.....	16
2.3.2	Specifické testy	17
2.4	Poruchy hemostázy a krevního oběhu	18
2.4.1	Krvácivé stavy	18
2.4.2	Trombofilní stavy	19
2.5	Antitrombotika	20
2.5.1	Antiagregancia	21
2.5.2	Antikoagulancia.....	23
3	Cíl práce.....	27
4	Metodická část	28
4.1	Cytotoxická aktivita.....	28
4.2	Agregace trombocytů	30
4.2.1	Zpracování krve dárců	31

4.2.2	Kvantifikace trombocytů v plazmě.....	32
4.2.3	Modifikace plazmy.....	33
4.2.4	Příprava roztoků činidel.....	34
4.2.5	Turbidimetrická agregometrie.....	35
4.3	Koagulační kaskáda.....	36
4.3.1	Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT).....	37
4.3.2	Protrombinový čas (PT).....	38
4.3.3	Trombinový čas (TT).....	39
4.4	<i>In vitro</i> hodnocení aktivity trombinu a faktoru Xa pomocí chromogenních substrátů.....	39
4.4.1	Chromogenní substrát pro trombin.....	40
4.4.2	Chromogenní substrát pro faktor Xa.....	42
5	Výsledky.....	45
5.1	Cytotoxická aktivita.....	45
5.2	Agregace trombocytů.....	46
5.3	Koagulační kaskáda.....	49
5.4	<i>In vitro</i> hodnocení aktivity trombinu a faktoru Xa pomocí chromogenních substrátů.....	51
6	Diskuze.....	54
7	Závěr.....	57
8	Seznam použité literatury.....	58

1 Úvod

Agregace trombocytů a hemokoagulace jsou klíčové procesy zajišťující zastavení krvácení. Při poškození endotelu cévy jsou trombocyty aktivovány a v místě poškození dochází k vytvoření primární destičkové zátky. Tato zátká je posílena fibrinovou sítí, jejíž vznik vyžaduje řadu koagulačních faktorů, proteinů, vyskytujících se běžně v krvi v neaktivním stavu. Postupná aktivace, vedoucí ke vzniku fibrinu, se nazývá koagulační kaskáda, která může být spuštěna vnější nebo vnitřní cestou. Fibrinolýzou je poté vzniklý trombus rozpuštěn. Důležitou funkci v cévním řečišti mají také faktory, které zabraňují nadměrné tvorbě trombů. Mezi ně patří např. antitrombin III nebo systém proteinu C.

Udržování rovnováhy hemostatického systému je zásadní pro správné fungování krevního oběhu. Narušení této rovnováhy může vést k patologickému krvácení, nebo naopak ke vzniku sraženin, které mohou pacienta vážně ohrozit na životě. Formování trombů je asociováno se závažnými stavy jako např. hlubokou žilní trombózu (HŽT) s následnou plicní embolií, infarktem myokardu (IM) nebo ischemickou cévní mozkovou příhodou (iCMP).

Na trhu jsou k dispozici léky nazývané antiagregancia a antikoagulancia, zabraňující patologickému vzniku trombů. Pro pacienta, jehož zdravotní stav vyžaduje antitrombotickou léčbu, přináší doposud užívaná léčiva nepopiratelné přínosy. Je třeba mít na paměti i mnohdy rozsáhlé lékové a potravinové interakce s nutností časté kontroly pacienta. Z antikoagulancií lze zmínit warfarin, který se na trhu vyskytuje desítky let, ale objevují se i nová inovativní léčiva. Mezi nimi lze zmínit např. rivaroxaban či dabigatran, známé pod skupinovým označením DOACs, pocházející z anglického: direct oral anticoagulants. Nelze opomenout subkutánně aplikované nefrakcionované a nízkomolekulární hepariny, které jsou v řadě situacích volbou antikoagulační léčby. Své místo v léčbě ze skupiny antiagregancii mají často užívaná kyselina acetylsalicylová, klopidogrel či tikagrelor.

Stále je snaha vyvíjet další léčiva a rozšířit spektrum léčebných možností pro pacienty vyžadující antiagregační nebo antikoagulační léčbu. Zkoumání nových molekul a jejich potenciální účinků na lidský organismus je klíčové pro objevování nových léčiv nebo výchozích sloučenin tzv. lead structures. V souvislosti s tím se tato

práce zabývá zkoumáním alkaloidu faspaplysinu. Faspaplysin již prokázal antineoplastické účinky a tato práce rozšiřuje možnosti zkoumání jeho antitrombotického působení. Uskutečněné testy zahrnují zdravé dárce, na jejichž plazmě s trombocyty byla testována cytotoxicita faspaplysinu a také jeho vliv na agregaci trombocytů. Zkoumán byl dále účinek alkaloidu na koagulační kaskádu, a to jak na vnitřní, tak i na vnější cestu aktivace. Specifické působení faspaplysinu na trombin a FXa ukázaly testy s chromogenními substráty.

2 TEORETICKÁ ČÁST

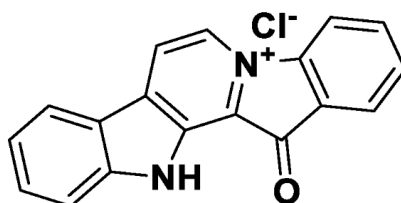
2.1 Fascaplysin

Fascaplysin je alkaloid izolovaný z mořské houby *Fascaplysinopsis bergquist* sp. Jedná se o pentacyklický alkaloid planární struktury, jehož základem je indol (**Obr. 1**). Poprvé byl izolovaný v roce 1988 z mořské houby na Fidji a později byla získaná z *F. reticulata* jeho analoga homofascaplysin A-C, které vykazují rovněž biologickou aktivitu (Mittapalli a Kumari 2024).

INN název: 13-oxo-12,13-dihydropyrido[1,2-a:3,4-b'] diindol-5-ium chlorid (Mittapalli a Kumari 2024)

CAS No.: 114719-57-2

Molekulární hmotnost: 306.75 g/mol (MedChemExpress, DS)



Obr. 1: Chemická struktura alkaloidu fascaplysinu. Převzato z: Wang et al. 2023.

2.1.1 Účinky

Fascaplysin prokazuje *in vitro* antiplazmodiální, analgetické a antineoplastické účinky. Objeven byl rovněž účinek zmírňující průběh Alzheimerovy choroby (Wang et al. 2023).

Antiplazmodiální

Fascaplysin prokázal inhibici kmenů *P. falciparum* K1 a NF54 (Wang et al. 2023). *Plasmodia* jsou prvoci způsobující malárii, závažné onemocnění přenášející se komárem rodu *Anopheles*. Po přenesení *Plasmodia* na mezipostitele, např. člověka, prochází prvek vývojovým stádiem v játrech a tzv. merozoiti poté napadají erytrocyty. Důsledkem toho dochází k ruptuře červených krvinek,

a to se projevuje mimo jiné horečkou, zimnicí, bolestí svalů a kloubů a zvracením (Rozsypal 2015).

Analgetický

Opioidní receptory, cíl silných analgetik a zneužívaných látek tzv. opiátů, jsou receptory spřažené s G proteinem. Působením opiátu však dochází k desenzibilizaci receptorů β -arrestinem, čehož důsledkem je vznikající tolerance na daný opiát s nutností zvyšování dávky léčiva pro stejný efekt (Raehal a Bohn 2014). Fascaplysin působí na opioidní receptory stejným mechanismem jako endogenní ligandy receptorů endorfiny, tedy jako vyvážený agonista opioidních receptorů a β -arrestinu. Tím se velmi snižuje riziko vzniku tolerance (Wang et al. 2023).

Alzheimerova choroba

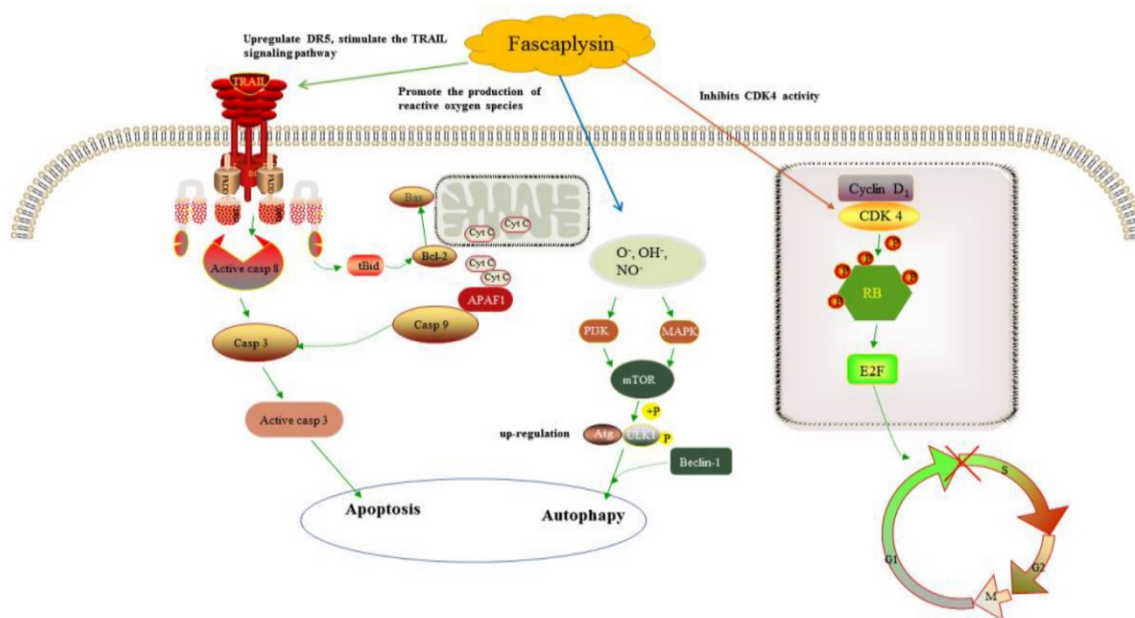
Fascaplysin nekompetitivně inhibuje acetylcholinesterázu (AChE), tzn. enzym, který degraduje neuromediátor acetylcholin, jehož nedostatek je jeden z příčin vzniku Alzheimerovy choroby. AChE je cílem doposud užívaných léčiv pro zpomalení progresu Alzheimerovy choroby donepezilu, galantaminu a rivastigminu (Wang et al. 2023).

Antineoplastický

Významný antineoplastický účinek působí na bázi více mechanismů:

- a) Inhibicí cyklin-dependentní kinázy 4 (CDK 4), která reguluje přechod buňky do fáze S buněčného cyklu, kde dochází k replikaci DNA a buňka se připravuje na buněčné dělení (Wang et al. 2023). Regulace se účastní také cyklin-dependentní kináza 6 (CDK6) a společně tvoří významný cíl pro působení protinádorových léčiv (Goel 2022).
- b) Indukcí TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL), čímž dojde k indukci apoptózy (Wang et al. 2023).
- c) Inhibicí angiogeneze, tzn. inhibicí novotvorby cév důležitých pro výživu nádorových buněk. Působení fascaplysinu je zprostředkováno inhibicí syntézy a působení vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (**Obr. 2**) (Wang et al. 2023).

Protinádorový účinek byl zkoumán na několika typech nádorových linií. Patří mezi ně buňky alveolárního rhabdomyosarkomu, leukemických buněk, melanomu apod., kde byly popsány další mechanismy působení (Wang et al. 2023).



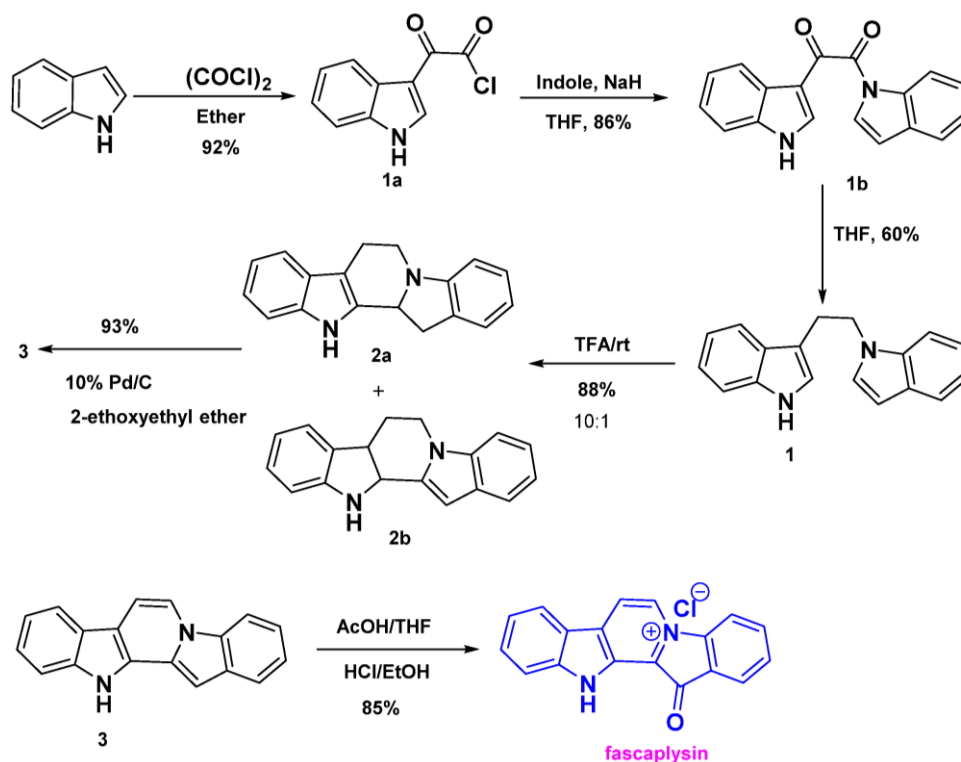
Obr. 2: Antineoplastický účinek faspaplysinu zahrnuje zvýšenou expresi receptoru DR5, čímž stimuluje TRAIL a tím apoptózu nádorové buňky. Inhibicí CDK 4 inhibuje faspaplysin přechod buňky do fáze S buněčného cyklu. Dále zvyšuje množství reaktivních forem kyslíku v buňce. Převzato z: Wang et al. 2023.

Antitrombotický účinek nebyl dostatečně prostudován. V práci Ampofo a kol. byl hodnocen z fyziologického hlediska na nedostatečně relevantním modelu (Ampofo et al. 2015).

2.1.2 Syntéza

Po izolaci faspaplysinu pracovaly různé výzkumné skupiny na chemické syntéze. Úplně první popsaná příprava z indolu jako výchozí látky je z roku 1990, tedy pouhé dva roky po izolaci z mořské houby (**Obr. 3**). Syntézu vyvinula skupina Gribble a kol. s celkovou výtěžností 65 %. Nicméně od té doby přišly další výzkumné skupiny s novými možnostmi. Častým výchozím produktem je např. tryptamin, z něhož připravily faspaplysin dokonce tři skupiny, Novikov a kol., Bharate a kol. a Tryapkin

a kol. Poslední zmíněná syntéza je podle dostupných zdrojů nejnovější, a to z roku 2023. Využívá metodu UV kvartenizace a výtěžek produktu dosahuje 90 %. Dále lze fascaplysin připravit např. z derivátů benzenu a pyridinu syntézou podle Qukguinera a kol. (Mittapalli a Kumari 2024).



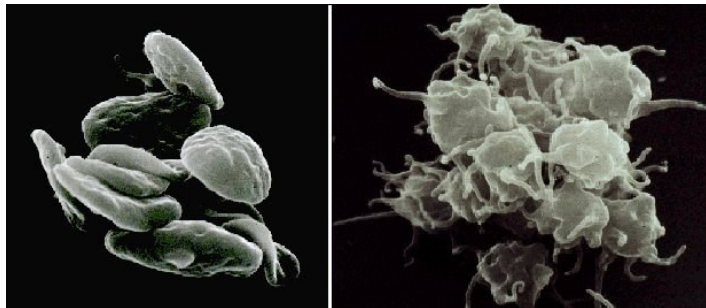
Obr. 3: První syntéza alkaloidu fascaplysinu z indolu vyvinutá v roce 1990. COCl_2 = oxalychlorid, Indol NaH = indolyl sodný, THF = tetrahydrofuran, TFA = kyselina trifluoroctová, Pd/C = palladium na uhlíku. Převzato z: Mittapalli a Kumari 2024.

Sedmikroková syntéza z indolu z roku 1990 spočívá nejprve v oxidaci indolu peroxokyselinou a následně reakcí vzniklého produktu s oxalychloridem. Indol reaguje s oxalychloridem za vzniku indol-3-glyoxylyl chloridu a jeho působením s indolem sodným vzniká ketoamid. Následnou redukcí se získá meziprodukt diindol. Působením trifluoroctové kyseliny vzniká směs cyklických produktů v poměru 10:1. Meziprodukt, který vznikl v nadbytku, se oxiduje za přítomnosti katalyzátoru palladia. Poslední krok ke vzniku fascaplysinu je reakce s kyselinou peroctovou (Mittapalli a Kumari 2024).

2.2 Hemostáza

Hemostáza neboli zástava krvácení je ochrannou funkcí organismu při poranění a podílí se zároveň na nespecifické obraně organismu (Penka et al. 2014).

Základní komponentou podílející se na hemostáze jsou trombocyty (krevní destičky), bezjaderné krevní elementy měnící svůj diskoidní tvar při aktivaci (**Obr. 4**). Fyziologický počet trombocytů v krvi je $150\text{--}400 \times 10^9$ trombocytů/L. Nižší hodnota destiček se nazývá trombocytopenie a počet vyšší, než je fyziologická hodnota, trombocytóza (Chottová Dvořáková a Mistrová, 2023).



Obr. 4: Vlevo zobrazen trombocyt v neaktivním stavu. Vpravo trombocyt s výběžky, tzv. filopodii, po aktivaci. Převzato z: Rozman et al. 2011.

Hemostáza je komplexní proces sestávající z primární a sekundární hemostázy. Vazokonstrikce, adheze trombocytů na místo poranění, jejich aktivace a agregace jsou součástí primární hemostázy. Zúžení cév omezuje přítok krve do poškozené cévy a snižuje ztrátu tekutin. Sekundární hemostáza je děj, kdy koagulační kaskáda aktivuje enzym fibrin, jenž stabilizuje trombocyty. Důležité je připomenout, že všechny tyto procesy, ač jsou popisovány odděleně, probíhají souběžně, nikoli postupně. Fibrinolýzou je následně tromb degradován (Penka et al. 2014).

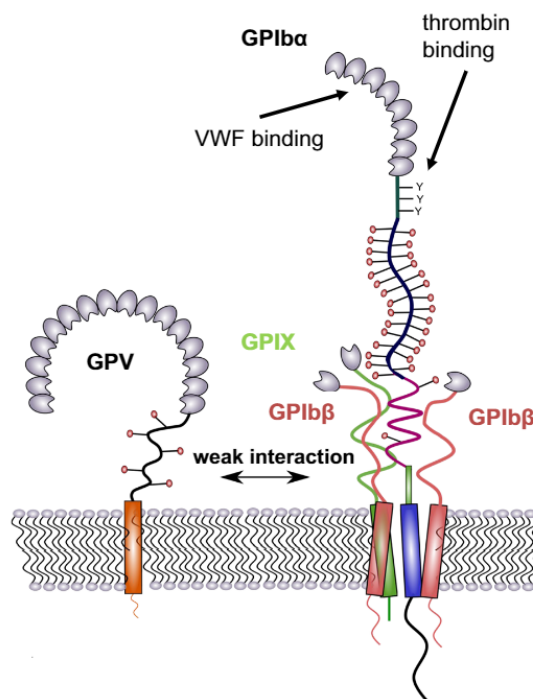
Proces hemostázy i fibrinolýzy je regulovaný. Při narušení rovnováhy ve směru nedostatečné odpovědi organismu dochází ke zvýšenému krvácení. Naopak při nadměrné aktivitě krevních destiček a koagulačního systému nebo defektu látek protisrážlivého působení vznikají tromby, krevní sraženiny. Tyto dysregulace v nutných případech vyžadují farmakologickou léčbu.

2.2.1 Primární hemostáza

Jednovrstevný epitel, tzv. endotel, tvoří vnitřní povrch cév, který za normálních okolností kryje subendotel tvořený mimo jiné kolagenem. Při poranění endotelu je subendotelový kolagen odhalen a dochází k adhezi trombocytů. Pro porozumění adheze jsou zásadní GP receptory, kterými trombocyty disponují. Chemicky se jedná o proteiny, aminokyseliny spojené peptidovou vazbou, s navázanou cukernou složkou.

V první řadě se na odhalený subendotelový kolagen naváže vWF, který je produkován endotelovými buňkami, trombocyty nebo megakaryocyty, což je prekursor trombocytu vznikající z hematopoetické kmenové buňky (Rokyta 2015).

Následuje vazba trombocytů na imobilizovaný vWF. Vazba je zprostředkována komplexem receptorů GPIb-V-IX, na vazbě se však nepodílí celý komplex. Ten se skládá ze 4 jednotek: GPIb α , GPIb β , GPV a GPIX (**Obr. 5**). Pro vazbu je zásadní GPIb α , který je disulfidickým můstkem spojen s podjednotkou GPIb β . Na GPIb α se nachází na N-konci vazebná místa pro vWF a také trombin, faktor koagulační kaskády (Estevez a Du 2017, Muttia et al. 2023).



Obr. 5: Struktura transmembránového komplexu receptorů GPIb-V-IX na trombocyty. Na podjednotce GPIb α je vazebné místo pro trombin a vWF. Slabší vazbou je

s komplexem receptorů spojena jednotka GPV, jenž se na vazbě s vWF nepodílí. Převzato z: Bendas et al. 2022.

Prvotní navázání destičky na vWF se zdá zásadní pro adhezi dalších trombocytů, nicméně tato vazba není příliš stabilní a je ovlivněna tokem krve. Pevnější vazba vzniká navázáním GPIX na vWF a dále přes receptor destiček GPVI, který tentokrát interaguje s kolagenem. Stejným způsobem se na kolagen může vázat GPIa/IIa (Estevez a Du 2017, Muttia et al. 2023).

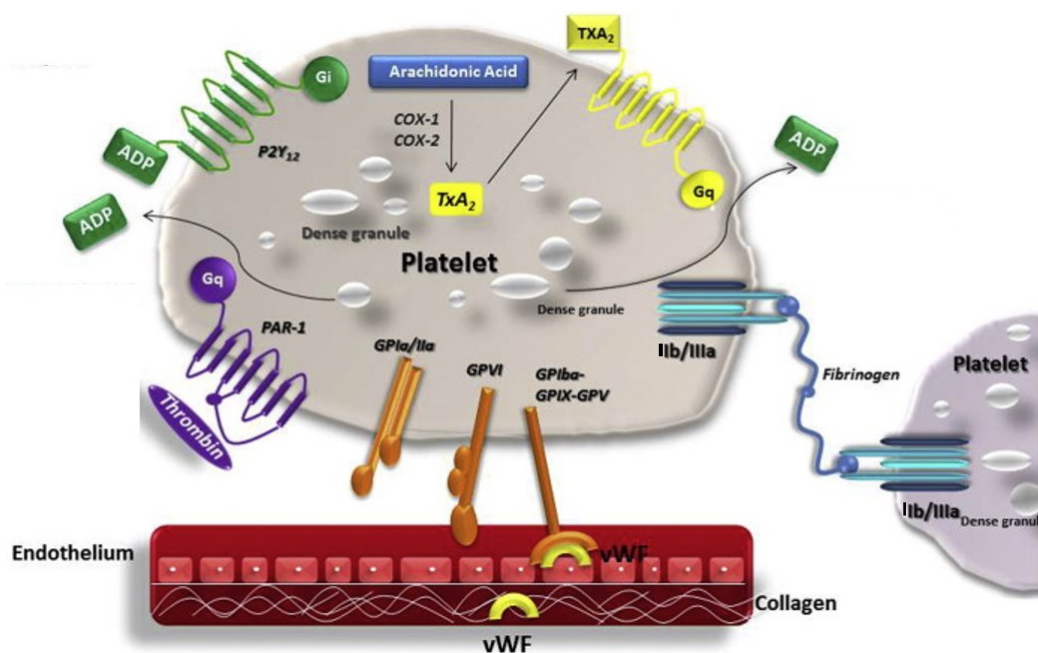
S adhezí trombocytů na subendotelovou matrix se pojí termín aktivace trombocytů. Aktivací se mění jejich konformace a dochází ke zvětšení povrchu, což usnadňuje jejich adhezi. Současně dochází k uvolnění obsahu granul destiček a modifikaci receptoru GPIIb/IIIa, známého jako integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ten slouží k vytvoření vazby s fibrinogenem, který je poté přeměněn na fibrin a váže se na další aktivované trombocyty totožným receptorem. Fibrinogen není jediným faktorem schopným vazby na tento receptor, zesílení trombocytů může zprostředkovat také vWF (Estevez a Du 2017, Muttia et al. 2023).

K aktivaci dochází již při vazbě trombocytů na vWF nebo interakcí se subendotelem. Trombin, faktor koagulační kaskády, nebo mediátory uvolněné z denzních granul trombocytů při aktivaci pak aktivují další trombocyty, čímž dochází k agregaci destiček (Estevez a Du 2017).

Trombocyty obsahují několik typů granulí. Pro hemostázu jsou důležité denzní a alfa granule. Již bylo zmíněno, že vWF může být produkovaný trombocyty. Uvolněn je právě z alfa granulí společně s fibrinogenem. Alfa granule obsahují zřejmě také GPIIb/IIIa a GPVI, receptory, které jsou transportovány na povrch destiček a hrají roli v dalším kroku hemostázy. Denzní granule obsahují mimo jiné adenosindifosfát (ADP), adenosintrifosfát (ATP) a serotonin, induktory agregace působící přes receptory spojené s G proteinem. Společně je uvolňovaný tromboxan A₂ (TXA₂), který se syntetizuje v buňce enzymem cyklooxygenázou (COX) z AK (Golebiewska a Poole 2015).

TXA₂ navozuje vazokonstrikci cév a také agregaci destiček jako ligand tromboxanového receptoru (TP). TP je receptor spřažený s G_q proteinem. Navázáním ligandu se aktivuje fosfolipáza C. Vzniklý produkt diacylglycerol (DAG) aktivuje

proteinovou kinázu a inositoltrifosfát (IP3) mobilizuje Ca^{2+} z endoplazmatického retikula. Aktivace buněčných dějů vede k aktivaci trombocytů. ADP je ligandem receptorů P2Y_1 a P2Y_{12} . Důležitý je druhý ze zmíněných receptorů. Jedná se o receptor spřažený s G_i proteinem, který po navázání ligandu ADP inhibuje adenylátcyklázu a zamezuje tak vzniku cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Výsledkem intracelulárních kaskád je aktivace trombocytů. Trombin aktivuje destičky přes receptory PAR-1 a PAR-4, skupinou receptorů opět spojených s G proteinem (**Obr. 6**) (Offermanns 2006).



Obr. 6: Trombocyt vázaný prostřednictvím komplexu receptorů GPIIb-IIIa na vWF. GPIIb a GPIIa se váže na subendotelový kolagen. Znárodněna je zde vazba GP IIb/IIIa na fibrinogen, který zasítuje vazbu s dalšími trombocyty. Z denzních granul destiček je uvolňován mediátor ADP, působící jako ligand na receptoru s G proteinem P2Y_{12} . Část ADP je uvolněna do extracelulárního prostoru za účelem aktivace dalších trombocytů. TXA_2 je syntetizovaný enzymem cyklooxygenázou z AK a působí jako ligand na TP receptorech. Enzym trombin aktivuje trombocyty vazbou na receptoru PAR-1. Převzato z: Marcucci et al. 2016.

2.2.2 Sekundární hemostáza

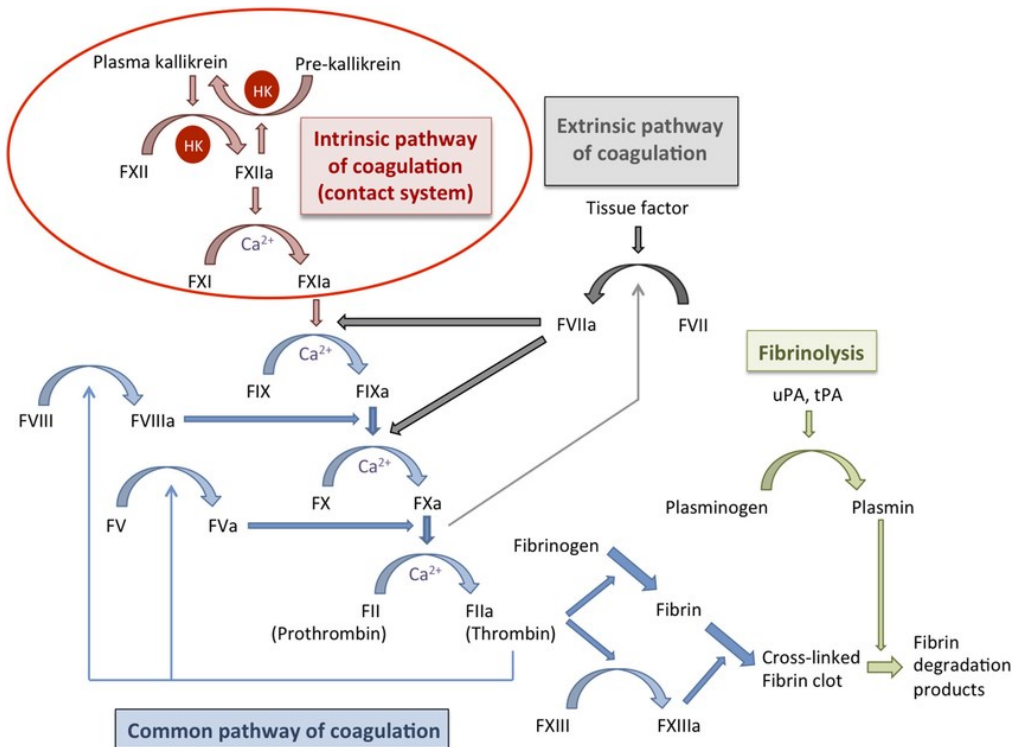
Koagulační systém se standartně rozděluje podle typu aktivace na vnitřní a vnější. Avšak při *in vivo* podmínkách je průběh sekundární hemostázy komplexnější

a převažuje myšlenka třífázového modelu hemostázy, která rozděluje koagulaci do tří fází:

- Iniclace
- Amplifikace
- Propagace

Pozornost bude proto věnována oběma přístupům.

U původního schématu koagulační kaskády bylo prokázáno, že se vnitřní i vnější systém může vzájemně aktivovat. Příkladem je FVIIa, který může aktivovat FIX vnitřní cesty aktivace. Opačně je schopný FXIIa aktivovat FVII. Obě cesty koagulace se setkávají v bodě aktivace FX na FXa. Schéma koagulační kaskády je znázorněno na **Obr. 7** (Penka et al. 2014).



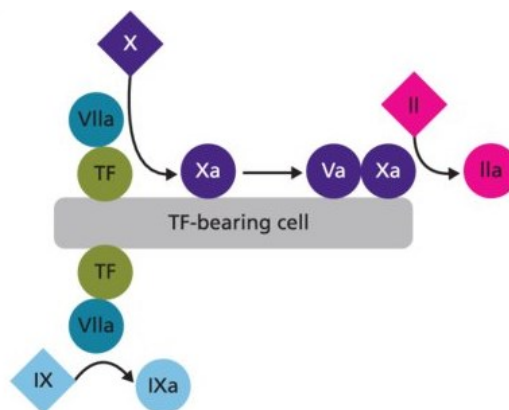
Obr. 7: Schéma koagulační kaskády. Zahrnuje vnitřní a vnější koagulační kaskádu včetně fáze fibrinolýzy. Převzato z: Loof et al. 2014.

Vnitřní dráha aktivace začíná při kontaktu se záporně nabitými složkami buněčné membrány. Na aktivaci FXII (Hagemanův faktor) se podílí kalikrein, enzym aktivovaný z prekalikreinu a vysokomolekulární kininogen (HMWK). Následující reakce probíhají za účasti Ca^{2+} , počínaje aktivace FXI a poté FIX. Následuje aktivace

FX, který vyžaduje FVIII aktivovaný trombinem. Zároveň je FX počátkem společné cesty aktivace. FXa aktivuje protrombin na trombin (FIIa) za účasti FVa jako kofaktoru. Trombin následně štěpí fibrinogen na monomery, které tvoří fibrinová vlákna, stabilizovaná FXIIIa (Rokyta 2015).

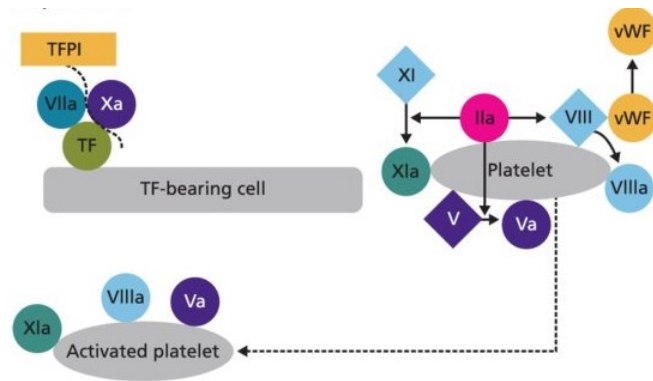
Vnější cesta aktivace začíná aktivací FVII kontaktem s tkáňovým faktorem (TF), odhaleným na subendotelu. FVIIa aktivuje nejen FX na FXa, místo, kde se schází obě cesty koagulační kaskády, ale může také aktivovat FIX, což bylo zmíněno jako příklad vzájemné aktivace obou cest. Následně dochází k aktivaci faktorů společné dráhy popsané u vnitřní dráhy koagulace (Rokyta 2015).

Třífázový model hemostázy zahajuje fáze iniciace. Poškozením cévy se exprimuje TF, který reaguje s FVIIa. Tento komplex dále aktivuje FIX na FIXa a FX na FXa. Tím dochází opět k aktivaci FVII pomocí FXa. FXa je v tuto chvíli schopný aktivovat trombin z protrombinu, který zatím nestačí pro vznik koagula, ale podporuje vznik dalšího trombinu (**Obr. 8**) (Penka et al. 2014).



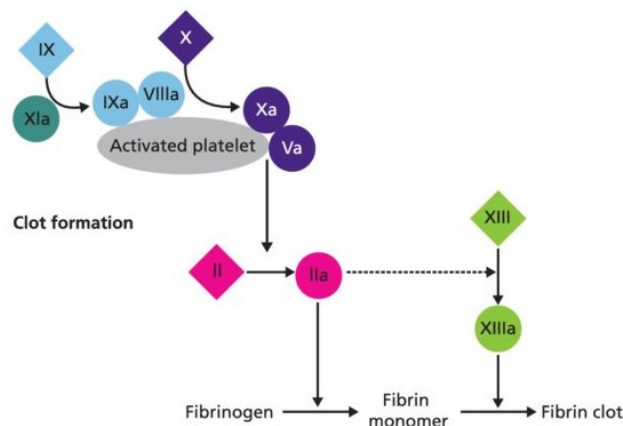
Obr. 8: Schéma první fáze iniciace třífázového modelu hemostázy. Převzato z: Turpie a Esmon 2011.

V druhé fázi tzv. amplifikace aktivuje vzniklý trombin faktor XI, VIII a V. FXIa aktivuje další FIX na FIXa. Trombin aktivuje trombocyty, jejichž záporný náboj vzniklý fosfolipidy na sebe váže aktivované faktory. Výsledkem je větší množství aktivního trombinu a aktivované trombocyty s navázanými koagulačními faktory (**Obr. 9**) (Penka et al. 2014).



Obr. 9: Schéma druhé fáze amplifikace třífázového modelu hemostázy. Převzato z: Turpie a Esmon 2011.

Poslední fáze je propagace. V tuto chvíli je komplex faktorů IXa a VIIIa vázán k FX. Aktivovaný FX tvoří komplex s FVa, tzv. komplex protrombinázy, který aktivuje protrombin na trombin. V této fázi již vzniká dostatečné množství na přeměnu fibrinu z fibrinogenu, finálního produktu koagulace. Nakonec je nestabilní fibrin stabilizován FXIII, stabilizujícím faktorem (**Obr. 10**) (Penka et al. 2014).



Obr. 10: Schéma třetí fáze propagace třífázového modelu hemostázy. Převzato z: Turpie a Esmon 2011.

2.2.3 Fibrinolýza

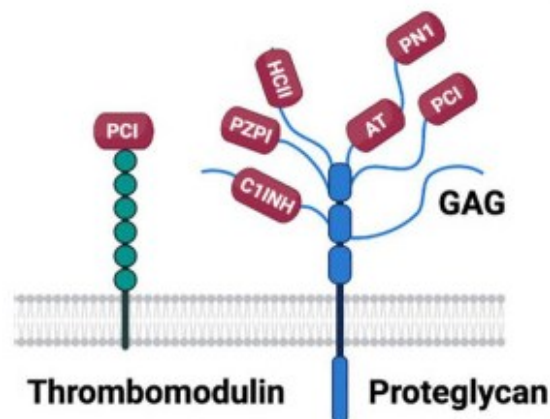
Při rozpouštění trombu má klíčovou roli plazminogen, který je konvertován na aktivní plazmin. Aktivace plazminogenu může nastat v cévách působením tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA), nebo v extracelulárním prostoru pomocí aktivátoru urokinázy (u-PA) (Penka et al. 2014).

Inhibici fibrinolýzy má na starosti více mechanismů. α_2 -antiplazmin (α_2 AP) inhibuje plazmin, zatímco inhibitor aktivátoru plazminu (PAI-1) inhibuje t-PA a u-PA. Trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI) je další komponent regulace. Již podle názvu je aktivován trombinem, konkrétně jeho navázáním na trombomodulin (TM), který zastává roli v inhibici hemostázy a je popsán v kapitole 2.2.4. Ač je TM součástí systému inhibujících faktory koagulační kaskády, vede k aktivaci TAFI, který zpomaluje degradaci fibrinu. TAFI je schopen odštěpit lysin z fibrinu. Tato aminokyselina je cílem pro navázání t-PA a plazminogenu na fibrin (Penka et al. 2014).

2.2.4 Regulace hemostázy

Systém hemostázy zahrnuje další komponenty, které se podílejí na udržení hemostatické rovnováhy. Působí antikoagulačním mechanismem a zabraňují tak nadměrnému či nežádoucímu vzniku trombů.

Významnou součástí je antitrombin III (AT III), který patří mezi tzv. serpiny, inhibitory serinových proteáz. Serinové proteázy mají ve svém aktivním místě aminokyselinu serin, která se jako nukleofilní centrum účastní štěpení proteinů. Mezi tyto serinové proteázy se řadí i některé enzymy koagulační kaskády včetně trombinu a FXa, jež jsou cílem AT III. Obě serinové proteázy štěpí enzym na aktivní formu. Trombin štěpí fibrinogen na fibrin a FXa štěpí protrombin na trombin. Nedostatek AT III se projevuje vážnými hyperkoagulačními stavy. Aktivita AT III je svázána s glukosaminoglykany (GAG) (**Obr. 11**). Po navázání AT III na záporně nabitý GAG se konformační změnou výrazně zvýší aktivita AT III. Jeho afinita k trombinu se zvýší až 100 000krát a zhruba 3500krát k FXa. Podmínkou je, aby GAG obsahoval alespoň 18 cukerných jednotek s konkrétní specifickou pentasacharidovou sekvencí. Mezi GAG patří heparin, který je produkovaný endotelem cév, ale známe ho také jako subkutánně podávané antikoagulancium, které vzniklo na podkladu endogenního heparinu (Penka et al. 2014).



Obr. 11: SERPINy se vážou na záporně nabitý GAG. Znáznorněna také vazba proteinu C (PC) na TM. Převzato z: Grover a Mackman 2022.

Dále lze jmenovat inhibitor tkáňového faktoru, který vytváří komplexy s enzymy vnějšího koagulačního systému, faktorem VII a X. Pravděpodobně nepředstavuje významný inhibitor a jeho defekt nezpůsobuje trombofilní stav (Penka et al. 2014).

Následuje systém PC. Součástí jsou dva receptory, TM a endotelový protein C receptor (EPCR). Trombin navázáním na TM ztrácí své koagulační vlastnosti a zároveň aktivuje PC, který se naváže na EPCR. PC štěpí poté faktory Va a VIIIa na neúčinné komponenty. Protein S plní funkci kofaktoru (Penka et al. 2014).

Antitrombotickým působením se vyznačuje dále endotel cév, který za fyziologických podmínek produkuje prostacyklin I₂ (PGI₂) a oxid dusnatý (NO). Prostacykliny jsou stejně jako tromboxany syntetizovány z AK, jejich funkce je však opačná. Mají silný antiagregační působení a navozují vazodilataci. Oxid dusnatý působí také jako vazodilatans a zabraňuje adhezi trombocytů na endotel cév (Neubauer a Zieger 2022).

2.3 Vyšetření hemostázy

Poruchy hemostázy mohou ovlivňovat různé části tohoto složitého systému. Z toho důvodu se při vyšetření krevní srážlivosti pacienta stanovují v první řadě screeningové testy, mezi které patří aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), protrombinový čas (PT) a trombinový čas (TT). Základem je také stanovení počtu trombocytů a hladiny fibrinogenu. V případě prokázání odchylek u základních

vyšetřeních jsou provedeny další specifické testy, které se zaměřují na nedostatek konkrétních koagulačních faktorů či dalších komponent podílejících se na hemostáze a její regulaci. Společně mohou být provedeny vyšetření na von Willebrandovu chorobu (Penka et al. 2014).

2.3.1 Screeningové testy

aPTT monitoruje vnitřní cestu aktivace koagulační kaskády a zahrnuje faktory XII, XI, IX, VIII, PK a HMWK. Hodnocení výsledků společně s testem PT poskytuje přesnější informaci o lokalizaci případného narušení koagulačního systému. V případě současného prodloužení PT stanovuje test aPTT také faktory X, V, II a fibrinogen, tj. faktory společné cesty koagulační kaskády. Princip této metody spočívá v přidání fosfolipidů (cefalinu) a povrchového aktivátoru (kyselina ellagová, kaolin) k plazmě s následně přidaným Ca^{2+} . Výsledný čas aPTT se vyjadřuje v sekundách nebo jako poměr aPTT testované plazmy a kontrolní plazmy. Tento poměr se označuje jako R. Nedostatek nějakého z vyjmenovaných faktorů se projeví prodloužením aPTT a touto metodou se monitoruje léčba nefrakcionovaným heparinem (Penka et al. 2014, Dulíček 2022).

PT monitoruje vnější cestu koagulační kaskády, tj. faktory VII, X, II, V a fibrinogen. Proces koagulace je aktivován přidáním tkáňového tromboplastinu společně s Ca^{2+} k plazmě. Výslednou hodnotu lze udávat opět v sekundách nebo poměru R. Oproti předchozí metodě se může udávat dále v procentech a často užívaným INR (International normalized ratio) (**Rovnice 1**). Nedostatek faktorů, který tento test hodnotí, se projeví zvýšením PT. Delší čas může poukazovat na deficit vitamínu K nebo léčbu antagonistou vitamínu K (warfarinem). Slouží tedy jako monitorace pacientů s touto léčbou (Penka et al. 2014).

Rovnice 1: Výpočet INR. ISI značí international sensitivity index.

$$INR = \left(\frac{PT \text{ testované plazmy (s)}}{PT \text{ testované plazmy (s)}} \right)^{ISI}$$

TT monitoruje přeměnu fibrinogenu na fibrin katalyzovanou trombinem. K plazmě se přidává FII, trombin, který aktivuje fibrinogen bez aktivace předešlých kroků koagulační kaskády. Výsledný čas je vyjádřen v sekundách (Penka et al. 2014).

Jako poslední jsou metody stanovení fibrinogenu. Jednou z nich je metoda dle Clause, kdy se nechá plazma inkubovat s nadbytkem trombinu. Výsledek v g/L se získá měřením zákalu daného vznikem vláken fibrinogenu nebo s využitím imunochemické metody, kde se využívají protilátky fibrinogenu (Penka et al. 2014).

2.3.2 Specifické testy

Specifické testy hodnotící hemostázu mohou cílit na primární hemostázu, tedy především aktivitu trombocytů, nebo sekundární hemostázu, tj. koagulační systém. Další testy hodnotí fibrinolýzu. Je to soubor několika selektivních metod, zde bude zmíněna jen turbidimetrická agregometrie a vyšetření D-dimerů jako častý test fibrinolýzy (Penka et al. 2014).

Agregace trombocytů je studována za přítomnosti induktorů agregace. Přidávána může být AK, kolagen, ADP, trombin nebo adrenalin a metodou turbidimetrické agregometrie se následně měří agregace daná změnou propustnosti světla přes kyvetu s plazmou bohatou na trombocyty (platelet-rich plasma, PRP). Referenčním bodem se 100% propustností světla je plazma chudá na trombocyty (platelet-poor plasma, PPP), zatímco PRP je považován za referenční bod s 0% průchodem světla. Během měření, po přidání činidla k indukci agregace k PRP, se snižuje zákal v mikrokvetě z důvodu vznikajících agregátů a tím se zvyšuje propustnost světla. Další metoda měření agregace využívá například impedanci, zde se ale pracuje s plnou krví. Výsledky agregace trombocytů jsou závislé na množství trombocytů v krvi a nedostatečná odpověď trombocytů poukazuje na jejich hypofunkci (Penka et al. 2014, Dulíček 2022).

Fibrinolýzu monitoruje vyšetření D-dimerů. D-dimery jsou produkty po štěpení fibrinu poukazující na koagulaci a následnou fibrinolýzu. Kvantifikace a hodnocení probíhá imunochemickou metodou, kdy se využívá protilátek proti D-dimerům. Zvýšené hodnoty poukazují na tromboembolickou nemoc, hepatopatii, ale zvýšené hodnoty jsou i po operacích, úrazech nebo fyziologicky např. při menstruaci nebo těhotenství (Penka et al. 2014, Dulíček 2022).

2.4 Poruchy hemostázy a krevního oběhu

Poruchy hemostázy jsou důsledkem narušení rovnováhy mezi prosrážlivými a protisrážlivými faktory. Vychýlení v prospěch prosrážlivých faktorů má za následek trombofilní stavy, v druhém případě dochází ke zvýšenému krvácení.

2.4.1 Krvácivé stavy

Mezi nejčastější poruchy se řadí trombocytopenie patřící mezi poruchy primární hemostázy dána nedostatkem trombocytů. Defekty sekundární hemostázy jsou například von Willebrandova choroba, hemofilie A a B nebo nedostatek vitamínu K jakožto kofaktoru syntézy faktoru II, VII, IX a X.

Von Willebrandova choroba vzniká narušením funkce nebo hladiny vWF. vWF je GP syntetizován v megakaryocytech nebo endotelu. Má zásadní roli v hemostáze, a proto může tato choroba, v závislosti na typu, způsobit závažné krvácení. Choroba se dělí na tři základní typy. První typ von Willebrandovy choroby je nejméně závažná forma, při které dochází k částečnému kvantitativnímu defektu, ale funkčnost vWF je zachována. Druhý typ zahrnuje kvalitativní změny vWF související například se zvýšenou afinitou k GPIb nebo poklesu afinity k FVIII. Poslední typ je nejzávažnější formou a jedná se o úplný nedostatek vWF (Penka et al. 2014).

Hemofilie A a B jsou krvácivé stavy vznikající defektem FVIII u hemofilie A a FIX u hemofilie B. Jedná se o recesivní dědičné onemocnění vázané na chromozom X. Ženy tedy bývají přenašečky tohoto onemocnění a projevy se vyskytují jen u mužů. Oba chybějící enzymy koagulační kaskády jsou syntetizovány játrech. FVIII vázaný v plazmě na vWF je kofaktor FIXa při aktivaci FX. Defekt vede u hemostázy ke vzniku primární destičkové zátky, která však není podpořena dostatečným množstvím fibrinu. Výsledkem je zpomalení nebo až nemožnost samovolného zastavení krvácení. Nejdůležitější část diagnostiky je pomocí aPTT testu monitorujícího vnější cestu aktivace koagulace (Penka et al. 2014).

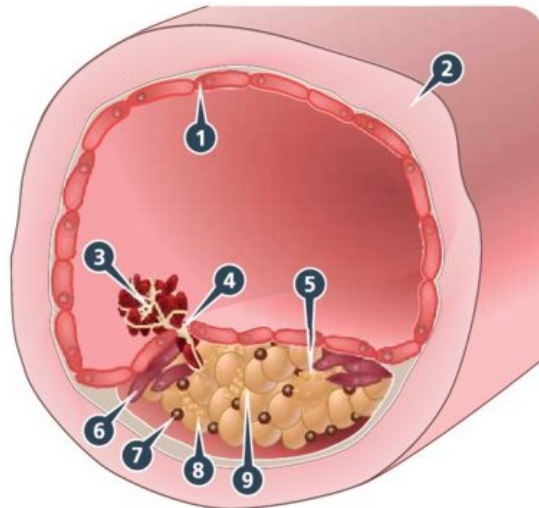
2.4.2 Trombofilní stavy

Vrozené trombofilní stavy souvisí s mutacemi genů pro faktory koagulační kaskády nebo inhibitory koagulace. Příkladem je Leidenská mutace, mutace FII, antitrombinu III nebo proteinu C a S.

Leidenská mutace je genetická porucha FV, který působí jako kofaktor při aktivaci FX. Aktivita FV je regulována systémem proteinu C, který FV štěpí na neaktivní formu. Mutací se stává FV odolnější vůči aktivovanému proteinu C. Výsledkem je nadměrná aktivita tohoto faktoru s rizikem žilního tromboembolismu. Ač se zvyšuje riziko vzniku trombu, nebývá v případě negativní anamnézy běžně užívána antikoagulační léčba (Kujovich 2011).

Trombus však nemusí vznikat jen na základě zmíněných příčin. Arteriální trombózy převážně souvisí s aterosklerózou. Ateroskleróza znamená ukládání lipidových částic, ale i makrofágů, buněk hladkého svalstva nebo Ca^{2+} iontů do endotelu cév (**Obr. 12**). Nebezpečný je nestabilní aterosklerotický plát, který může svým odtržením obnažit kolagen a tkáňový faktor, které aktivují adhezi a agregaci trombocytů. Ateroskleróza je hlavní příčinou onemocnění označujících se souhrnným názvem ischemická choroba srdeční (ICHS). Při těchto onemocněních není srdci dodáváno dostatečné množství krve a kyslíku. Zúžení průsvitu cév s provázející svíravou bolestí na hrudi, např. po zátěži, se označuje jako stabilní angina pectoris. Pokud dojde k uvolnění aterosklerotického plátu a agregaci trombocytů, dochází ke vzniku akutních forem ICHS. U kompletního uzavření koronární tepny nastává IM, u neúplného uzavěru hovoříme o nestabilní angině pectoris.

- 1 Endothelium
- 2 Vessel wall
- 3 Thrombus
- 4 Rupture of plaque
- 5 Foam cell
- 6 Smooth muscle cell
- 7 Tissue factor
- 8 Cholesterol
- 9 Necrotic core



Obr. 12: Průřez aterosklerotickou cévou. Ateroskleróza vzniká kumulací mimo jiné lipidových částic, které jsou pohlceny makrofágy. Tím vznikají tzv. pěnové buňky. Znárodněn je TF a agregace trombocytů. Převzato z: Turpie a Esmon 2011.

U onemocněních souvisejících s aterosklerózou se užívají antiagregancia (protidestičkové léčiva). Antiagregační léčba je součástí akutní péče o pacienty s akutní formou ICHS, ale také následné farmakologické léčby v rámci sekundární prevence, kdy terapie antiagregancii v souhře s dalšími léčivy významně snižuje kardiovaskulární mortalitu.

Žilní trombóza je důsledkem stagnace krve v žilním systému z důvodu imobilizace, fixace končetin nebo dehydratace společně s poškozeným endotelem. Zvýšená koncentrace koagulačních faktorů a jejich kontakt s TF je podkladem pro tromboembolickou nemoc (TEN), kdy trombus vzniklý v dolních končetinách způsobí obstrukci v plicním arteriálním řečišti (Rokyta 2015).

2.5 Antitrombotika

Antitrombotika zahrnují léčiva inhibující agregaci trombocytů a koagulační systém. Oba tyto systémy jsou propojeny a vzájemně se aktivují, příkladem je aktivace trombocytů trombinem. Z důvodu souběžných a na sobě závislých dějů ovlivňují antiagregancia negativně také koagulaci krve a opačně. V závažných akutních případech může užívání léčiva z obou skupin přinášet benefit pro pacienta za současného vysokého rizika krvácení. Běžnější je užívání duální antiagregační

léčby, kdy se kombinuje převážně kys. acetylsalicylová s inhibítozem ADP receptoru (Švihovec a kol. 2018).

2.5.1 Antiagregancia

Antiagregancia působí na fáze primární hemostázy, tj. adhezi trombocytů, jejich aktivaci a agregaci. Na trhu zatím nejsou dostupná léčiva, která inhibují adhezi destiček na subendotel. Tyto léčiva působící na vWF nebo GPIb jsou ve fázi vývoje. Největší skupina léčiv zasahuje do fáze aktivace trombocytů. Patří sem kyselina acetylsalicylová (ASA) nebo inhibitory ADP receptoru. Do skupiny léčiv zasahujících do aktivace se řadí dále inhibitory fosfodiesterázy 3 (PDE-3) nebo blokátory serotoninových receptorů, které jsou využívány pro vazodilatační účinky. Dále jsou dostupné inhibitory GP IIb/IIIa zasahující do agregace trombocytů (Švihovec a kol. 2018).

a) Inhibitory COX

Nejužívanější antiagregans je ASA. Při vyšších dávkách působí jako analgetikum a antipyretikum, při nižší dávce 75-100 mg denně jako antiagregans. Mechanismus účinku takto nízké dávky spočívá v inhibici destičkové COX 1, která je zodpovědná za syntézu TXA₂ z AK. Inhibice COX je ireverzibilní. Acetylací serinu v aktivním místě COX zabraňuje syntéze TXA₂. Trombocyt po dobu životnosti (5-7 dní) není z důvodu chybějícího genetického aparátu schopný syntetizovat nový enzym (Švihovec a kol. 2018).

Hlavním nežádoucím účinkem je riziko krvácení. Může se projevit tvorbou modřin, nebo až krvácením do trávicího traktu. Riziko je zvýšené při užívání inhibitorů COX v kombinaci s dalšími rizikovými léčivy, tj. antikoagulancia, NSAID, inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) nebo glukokortikoidy. Mezi nežádoucí účinky patří také nauzea, zvracení, pyróza nebo vznik gastroduodenálního vředu. U astmatiků je riziko vzniku aspirinového astma, kteří by se proto měli jejímu užívání vyhýbat. Kontraindikacemi jsou na základě nežádoucích účinků astma, krvácení a aktivní vředová choroba (Švihovec a kol. 2018).

Společné užívání léčiva s inhibitory protonové pumpy (PPI) může snížit účinek ASA, neboť se jedná o slabou kyselinu, která se vstřebává v žaludku v nedisociované formě (Švihovec a kol. 2018).

ASA je užívána jako sekundární prevence při manifestaci aterosklerózy nebo ICHS. Významně tak snižuje mortalitu kardiovaskulárních onemocnění. Po IM a s ní spojenou koronární intervencí nebo po zavedení stentu se volí duální antiagregační léčba, kdy se ASA kombinuje s ADP inhibitory. V primární prevenci se antiagregační léčba volí jen u pacientů s vysokým rizikem kardiovaskulárního onemocnění (KVO) (Švihovec a kol. 2018).

Do této skupiny patří indobufen, který však nemá využití a odlišuje se schopností reverzibilně inhibovat COX 1 (Švihovec a kol. 2018).

b) Inhibitory ADP receptoru

Receptor P2Y₁₂ pro ADP je cílem léčiv, které lze rozdělit do tří generací. První je dnes již obsoletní a neužívaný tiklopidin. Druhá generace přináší klopidogrel a do třetí generace s rychlým efektem patří prasugrel, tikagrelor a kangrelor. Inhibicí P2Y₁₂ se zvyšuje množství cAMP v intracelulárním prostoru a trombocyt se stabilizuje. Účinek se liší také podle povahy inhibice. Klopidogrel, prasugrel a tiklopidin inhibují destičky ireverzibilně, což je vhodné pro dlouhotrvající účinek po dobu životnosti inhibovaných trombocytů. Nevýhoda spočívá v případě krvácení a nutnosti vysazení antiagregancia. Reverzibilní blokátor tikagrelor a kangrelor přináší riziko při vynechání dávky vzhledem k účinnosti léčiva po dobu účinné plazmatické koncentrace (Švihovec a kol. 2018).

Léčiva jsou podávána perorálně s výjimkou kangreloru, který je aplikován intravenózně a jeho biologický poločas trvá v řádu minut. Druhá generace, tj. klopidogrel se vyznačuje pomalým nástupem účinku z důvodu transformace na účinný metabolit (Švihovec a kol. 2018).

Mezi nežádoucí účinky patří krvácení, což je společné pro všechna antitrombotika. Závažná leukopenie a trombocytopenie se může vyskytnout u tiklopidinu, proto se dnes již neužívá. U 5 % pacientů se při léčbě tikagrelorem vyskytne dušnost. Kromě inhibice P2Y₁₂ dochází vlivem léčiva ke zvýšení koncentrace adenosinu. Ten působí na adenosinové receptory na trombocytech, čímž se podporuje

stabilizace, ale působí také na adenosinové receptory v mozku, čímž se ovlivňuje dechové centrum a u části pacientů se projevuje dušností (Švihovec a kol. 2018).

Významnou interakcí je interakce mezi klopidogrelem a inhibitory protonové pumpy, tj. omeprazol, pantoprazol a další. Omeprazol je inhibitor CYP2C19 a jak bylo zmíněno, klopidogrel se metabolizuje na aktivní formu právě přes tento isoenzym. Omeprazol tedy snižuje množství klopidogrelu v krvi a pacienta ohrožuje vznikem trombu. V případě kombinace je nejvhodnější záměna omeprazolu za jiné PPI, např. rabeprazol nebo pantoprazol, případně volit inhibitor ADP třetí generace (Švihovec a kol. 2018).

c) Inhibitory GPIIb/IIIa

Další jmenovanou skupinou jsou inhibitory GP IIb/IIIa abciximab, eptifibatid a tirofiban. Tyto léčiva blokují vazebné místo pro vWF nebo fibrinogen, ale nezabraňují uvolnění granúl trombocytů. Jsou vhodné do kombinace s ASA nebo inhibitory ADP receptoru, popřípadě heparinem. Blokací GP IIb/IIIa může paradoxně dojít k aktivaci receptoru a spuštění agregace. Abciximab je monoklonální protilátka vázající se silnou vazbou na pojednotku IIb, ale mírně působí i na další integriny trombocytů. Eptifibatid je heptapeptid získaný z hadího jedu a jeho působení je poměrně kratší oproti abciximabu. Obě látky se musí podávat intravenózně (Švihovec a kol. 2018).

2.5.2 Antikoagulancia

Antikoagulancia cílí na tři základní cíle sekundární hemostázy: FII (trombin), FXa nebo na více faktorů současně. Jak bude vysvětleno, trombin a FXa mohou být inhibovány přímo, anebo nepřímo působením přes AT III. Přímou inhibici zprostředkovávají DOACs, nepřímo inhibici heparin. Ovlivnění více koagulačních faktorů je dosaženo inhibicí syntézy vitamínu K, který je kofaktor při syntéze faktorů v játrech (Švihovec a kol. 2018).

a) Nepřímé inhibitory trombinu a FXa

Hepariny způsobují antikoagulační účinek vazbou na AT III, který inhibuje trombin a FXa. Vazbou heparinu na antitrombin se změní konformace molekuly a dochází

k vyšší aktivitě a inhibici trombinu a FXa. Kromě protisrážlivých účinků má heparin také reparační schopnosti v místě rány (Švihovec a kol. 2018).

Hepariny jsou glukosaminoglykany, proteoglykany složené z opakujících se disacharidových jednotek. Délka jejich řetězce ovlivňuje farmakologické vlastnosti. Heparin obsahuje zhruba 50 disacharidových jednotek. Velké využití mají fragmenty s 12-24 jednotkami, tzv. nízkomolekulární hepariny, kde převládá inhibice FXa nad trombinem z důvodu zkracování řetězce. Jejich výhodou je vyšší biologická dostupnost po aplikaci, delší doba působení s předvídatelnější degradací a tím přesnější předvídatelností účinku. Zástupci této skupiny jsou enoxaparin, dalteparin a nadroparin. Volbou může být i samotná pentasacharidová jednotka potřebná pro antikoagulační efekt nazývaná fondaparinux (Švihovec a kol. 2018).

Nevýhoda heparinu spočívá v inhibici pouze volných faktorů, nikoli těch vázaných na fibrinová vlákna. Neúčinnost nastává ve chvíli nedostatečného množství AT III u pacienta. Poslední komplikací je nutnost subkutánního či intravenózního podávání (Švihovec a kol. 2018).

Společným nežádoucím účinkem je opět krvácení. Mezi další nežádoucí účinek především u nefrakcionovaného heparinu patří vznik heparinem-indukované trombocytopenie (Švihovec a kol. 2018).

Tato skupina léčiv má využití jako prevence srážení krve u hemodialýzy, jako krátkodobá antikoagulační léčby při riziku vzniku TEN nebo u léčbu trombofilních stavů (Švihovec a kol. 2018).

b) Přímé inhibitory trombinu

Jediný zástupce této skupiny dabigatran se váže na aktivní místo trombinu a zabraňuje tak aktivaci fibrinogenu. Mírně ovlivňuje také další koagulační faktory V, VIII a IX. Dabigatran se podává perorálně, stejně jako ostatní léky ze skupiny DOACs. Jeho absorpce je závislá na P-GP. Inhibitory P-GP jako azolová antimykotika, klaritromycin, verapamil a další zvyšují množství dabigatranu v krvi a jeho antikoagulační působení. Induktory, mezi které patří např. třezalka, dexamethason nebo fenobarbital snižují absorpci léčiva (Švihovec a kol. 2018). Kromě standartního nežádoucích účinku krvácení se může vyskytnout dyspepsie.

Indikacemi dabigatranu je prevence embolizace u pacientů s fibrilací síní nebo jako prevence a léčba TEN (Švihovec a kol. 2018).

c) Přímé inhibitory FXa

Mechanismus účinku spočívá v inhibici aktivace trombinu. Protisrážlivý účinek je podpořen inhibicí aktivace trombocytů, jelikož mohou být aktivovány trombinem působením na receptor PAR-1. Užívanými zástupci tzv. xabanů jsou apixaban, rivaroxaban, endoxaban (Švihovec a kol. 2018).

Oproti dabigatranu není biologická dostupnost závislá na aktivitě P-GP. Významnější interakce u apixabanu a rivaroxabanu je daná farmakokinetickou interakcí na CYP450. Největší roli hraje enzym CYP3A4, jehož inhibice zvyšuje účinek antikoagulancií. Mezi silné inhibitory patří např. klaritromycin nebo opět azolová antimykotika. V opačném případě se účinek snižuje (Švihovec a kol. 2018).

Indikace jsou podobné jako u dabigatranu. Xabany mají využití u prevence nebo léčby žilních trombóz, dále jako prevence iCMP u fibrilace síní a rivaroxaban v rámci sekundární prevence atherotrombotických příhod (Švihovec a kol. 2018).

d) Antagonista vitamínu K

Mechanismus účinku warfarinu spočívá v inhibici karboxylace koagulačních faktorů a nevytvoření tak funkční skupiny přenesené z vitamínu K. Vitamín K se podílí jako kofaktor na syntéze faktorů VII, IX, X a trombinu v játrech. Účinkem warfarinu dochází i ke snížení syntézy proteinu C a S. Nejprve nastane snížení koncentrace proteinu C z důvodu nejkratšího plazmatického poločasu. Jeho funkcí je inhibice koagulace, proto v prvních dnech léčby dochází k hyperkoagulačnímu stavu. Než dojde k depleci i koagulačních faktorů a tím nastoupení účinku warfarinu, je v kombinaci užíván typicky heparin (Švihovec a kol. 2018).

Oproti DOACs nemá warfarin tolik předvídatelný účinek, dávkování je proto voleno podle výsledků koagulačních testů PT, vyjadřovaném v INR. Interakce spočívá především v enzymu CYP2C9, který přeměňuje warfarin na méně aktivní izomer. Plazmatické hladiny warfarinu ovlivňují nejen další léčiva působící inhibicí či indukci CYP2C9, ale také častý polymorfismus enzymu. Pacienti musí udržovat stabilní přísun vitamínu K, jehož nadměrná konzumace snižuje účinek léčiva (Švihovec a kol. 2018).

Léčivem volby je u fibrilací síní, ale užívá se u všech trombotických příhod i z důvodu jeho dlouhodobého užívání a ověřené účinnosti (Švihovec a kol. 2018).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je zhodnocení alkaloidu fascaplysinu jako potenciální antitrombotické látky ve fyziologických relevantních vzorcích.

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Cytotoxická aktivita

Jednou z možností, jak hodnotit vliv látek na proliferaci buněk nebo naopak určit jejich toxicitu, jsou metody založené na spektrofotometrii. Mezi další metody lze jmenovat například světelnou a elektronovou mikroskopii nebo cytofluorometrii (Galluzzi et al. 2009).

Princip stanovení cytotoxicity využívající spektrofotometrii spočívá v inkubaci buněk s lehce zbarvenými či bezbarvými tetrazoliovými solemi, které se za přítomnosti buněčných enzymů redukují na výrazně zbarvené deriváty (Berridge et al. 2005).

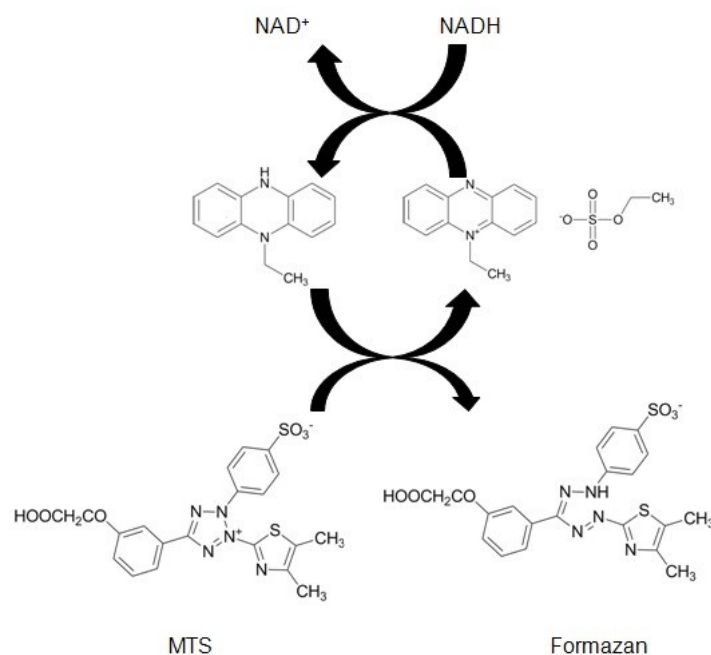
Zmíněné enzymy katalyzují přenos elektronů. K reakci dochází však pouze za přítomnosti životaschopných buněk. Mezi vznikem barevného derivátu a počtem metabolicky aktivních buněk je tedy přímá úměra. Mezi užívané tetrazoliové soli patří MTT, MTS nebo WST-1, jež byly pojmenovány na základě své chemické struktury, s výjimkou WST-1, což je obecný název pro tetrazoliové soli rozpustné ve vodě, v angličtině „Water Soluble Tetrazolium“ (Galluzzi et al. 2009).

Rozdíl mezi MTT a solemi MTS a WST-1 spočívá v produktu reakce. U MTT vzniká redukci mitochondriálními enzymy ve vodě nerozpustná sůl formazanu, jež se hromadí v cytosolu buňky. Smrtí buňky dojde k uvolnění barevné soli a ta je následně spektrofotometrií detekována. V případě MTS a WST-1 vzniká ve vodě rozpustný formazan, který prochází membránou buněk a není pro ně toxický (Galluzzi et al. 2009).

Výhody testu cytotoxicity s použitím tetrazoliových solí spočívají v nenáročnosti metody na laboratorní vybavení a také jsou v porovnání s dalšími metodami méně finančně nákladné. Současně lze zkoumat několik vzorků najednou a konkrétně u testu s rozpustnými produkty reakce (MTS nebo WST-1) lze sledovat vliv zkoumané látky na proliferaci buněk v čase (Galluzzi et al. 2009).

Toxicita faspaplysinu na lidské trombocyty byla hodnocena s využitím MTS assay. Chemický název soli je 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium. Její redukci vzniká fialově zbarvený produkt formazan za současné oxidace NADH na NAD⁺ (Galluzzi et

al. 2009). MTS se užívá společně s fenazinem ethosulfátem, který se účastní přenosu elektronů a usnadňuje redukci tetrazoliové soli (Berridge et al. 2005) (**Obr. 13**).



Obr. 13: Redukce MTS na formazan za současné oxidace NADH. Fenazin ethosulfát usnadňuje redukci MTS soli. Převzato z: Riss et al. 2013.

Testování probíhalo na 96-jamkové mikrotitrační destičce, která je často užívaná pro paralelní analýzu vzorků. Mezi testovaná činidla patřil faspaplysin v koncentracích 0.1 μM , 1 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM a 100 μM . Testem cytotoxicity byl podroben dále dimethylsulfoxid (DMSO) 0.1% jako blank a detergent dodecylsírán sodný (SDS) 10%, který usmrcuje všechny buňky.

Roztok faspaplysinu vznikl naředěním lyofilizátu lahvičky o hmotnosti obsahu 1 mg, který je při teplotě - 20 °C stabilní po dobu až tří let. Po přidání 326 μL DMSO vznikl roztok o koncentraci 10 mM, který se uchovává v alikvotech v mrazu při teplotě - 20 °C, se stabilitou minimálně 1 měsíc od zředění (MedChemExpress HI).

Rozpouštědlo DMSO byl uchováván při pokojové teplotě mimo zdroj světelného záření.

Pro hodnocení cytotoxicity byla získána PRP od 3 zdravých dárců. Před jejím smísením s analyzovanými látkami do určené koncentrace byla PRP upravena na jednotné množství trombocytů 3×10^8 trombocytů/mL. Proces je podrobněji popsán

v následující části 4.2 věnující se hodnocení vlivu fascaplysinu na agregaci trombocytů.

Metoda dále spočívala v pipetování objemu 100 μL připravených roztoků analyzovaných látek s PRP do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky po triplicátech. Roztoky byly inkubovány 24 hodin a poté se do jednotlivých jamek přidalo 20 μL MTS. Následovala opět inkubace mikrotitrační destičky po dobu 4 hodin při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$ a atmosféře 5 % CO_2 . Po dokončení inkubace byla viabilita buněk zhodnocena na přístrojovém vybavení Hidexu (Hidex, Turku, Finsko) metodou spektrofotometrie, kde bylo měřeno množství absorbovaného záření při vlnové délce 490 nm.

4.2 Agregace trombocytů

Pro experimentální hodnocení vlivu alkaloidu fascaplysinu na agregaci trombocytů byla použita krev od 10 zdravých dárců. Tato skupina dárců zahrnovala 50 % žen a 50 % mužů pro zachování reprezentativního vzorku (**Obr. 14**). Průměrný věk byl přibližně 27 let. Aby bylo eliminováno ovlivnění výsledků agregace trombocytů, byli dárči poučeni, aby se na odběr dostavili nalačno. Dále byli instruováni, aby se v předchozím dni vyvarovali užívání alkoholu a léčiv, které by mohly ovlivnit reaktivitu trombocytů, např. nesteroidní antiflogistika (NSAID). Krev byla dárcům odebírána ráno, bezprostředně před užitím k experimentu. Odběr probíhal do zkumavky s citrátovým pufrům, jenž plní funkci protisrážlivého činidla.



Obr. 14: Zastoupení pohlaví dárců v experimentu.

U poloviny dárců proběhl výzkum vlivu fascaplysinu na trombocyty za použití AK jako klíčového faktoru indukce aktivity trombocytů (**Tab. 1**). U druhé poloviny dárců byl za stejným účelem použit při experimentu kolagen (**Tab. 2**). Pro poskytnutí přehledu o fyzickém stavu dárců, zahrnují získaná data od jedinců také jejich věk, výšku a váhu.

Na základě zmíněných údajů se vypočítalo BMI. U většiny dárců se BMI pohybuje v normálních hodnotách, tedy od 18.5 do 24.9 kg/m² či v lehké nadváze, která je definována hodnotami 25–29.9 kg/m².

Tab. 1: Seznam dárců, jejichž plazma byla užitá k experimentu s AK.

Arachidonová kyselina					
Vzorek č.	Pohlaví	Věk	Výška [cm]	Váha [kg]	BMI [kg/m²]
1	M	26	175	68	22.20
2	M	28	170	65	22.49
3	Ž	25	161	62	23.92
4	Ž	23	163	59	22.21
5	Ž	28	173	61	20.38

Tab. 2: Seznam dárců, jejichž plazma byla užitá k experimentu s kolagenem.

Kolagen					
Dárce č.	Pohlaví	Věk	Výška [cm]	Váha [kg]	BMI [kg/m²]
6	M	35	158	57	22.83
7	M	24	179	85	26.53
8	M	27	170	74	25.66
9	Ž	24	173	80	26.73
10	Ž	28	165	67	24.61

4.2.1 Zpracování krve dárců

Plnou krev od dárce bylo nezbytné bezprostředně po odběru centrifugovat. Tento proces probíhal v citrátových zkumavkách na stolní centrifuze při 1000 otáčkách za minutu (rpm) po dobu 10 minut. Po skončení centrifugace byla krev ve zkumavce viditelně separována na dvě vrstvy. V dolní části zkumavky se nacházely erytrocyty, zatímco v horní části PRP. PRP se separovala pomocí vhodné velikosti automatické pipety do předem označené Falcon zkumavky. Dbalo se na důkladné odebrání plazmy bez příměsi erytrocytů. Po odebrání maximálního množství PRP byly citrátové zkumavky opět centrifugovány na 10 minut při 4000 rpm. Po dokončení procesu

se stejným způsobem jako v předešlém kroku odebrala PPP, do druhé označené Falcon zkumavky. Odběr probíhal opět bez přídavku erytrocytů. Teplota PRP a PPP byla po dobu experimentu udržována na 37 °C.

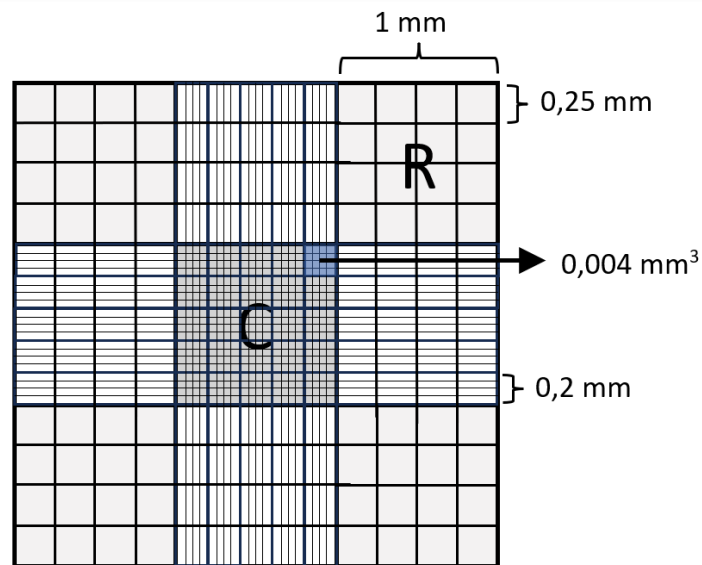
4.2.2 Kvantifikace trombocytů v plazmě

Pro experiment bylo stanoveno jednotné množství trombocytů v plazmě na 3×10^8 trombocytů/mL. Kvantita trombocytů se zhodnotila pomocí komory dle Neubauera, která patří mezi rozšířenou metodu počítání buněk v biologických vzorcích.

Neubauerova komůrka se skládá z podložního skla, na jejímž středu se nachází dvě počítací komory. Na vrchní stranu podložního skla se pomocí dvou kovových svorek připevnil skleněný kryt. Tímto mezi oběma skly vznikl prostor o výšce 0.1 mm.

Roztok, jenž byl aplikován do počítací komory, se připravil smísením 5 μ L PRP a 195 μ L dH₂O. Automatickou pipetou se z připraveného roztoku odebralo 10 μ L a aplikovalo se do horní počítací komory mezi podložní a krycí desku. Stejně množství roztoku se pipetovalo do dolní komory.

Trombocyty se pozorovaly s využitím optického mikroskopu na počítací mřížce (**Obr. 15**). Při užití objektivu mikroskopu se zvětšením 10x, lze pozorovat 9 velkých čtverců o délce strany 1 mm a objemu 0.1mm³. Buňky v biologickém materiálu lze počítat na rohovém nebo centrálním čtverci. Rohové části slouží především k počítání částic větších 10 μ m, mezi něž patří např. leukocyty. Centrální čtverec, jenž sloužil i pro naše účely, slouží ke kvantifikaci trombocytů a erytrocytů. Tento centrální prostor je pod objektivem mikroskopu se zvětšením 40x rozdělen do 25 menších čtverců. Objem jednoho tohoto čtverce činí 0.004 mm³ s délkou strany 0.2 mm (Walberg 2001). Trombocyty se sčítaly v náhodně vybraných dvou čtvercích z horní komory podložního skla a dvou čtvercích z dolní komory. Při sčítání trombocytů se postupovalo systematicky zleva doprava, přičemž se do celkového počtu nepočítaly buňky přilehlé na dolní a levé straně čtverce.



Obr. 15: Počítací mřížka komory dle Neubauera s uvedeným rozměrem stran či objemem čtverce. R = rohový čtverec, C = centrální čtverec. Modře označený čtverec o objemu 0.004 mm^3 slouží k sčítání trombocytů.

Ze získaných hodnot trombocytů z optického mikroskopu se vypočítalo množství trombocytů v 1 mL PRP (**Rovnice 2**).

Rovnice 2: Výpočet množství trombocytů na 1 mL PRP. $\emptyset \text{ tr.}$ = průměr trombocytů ve čtvercích o objemu 0.004 mm^3 .

$$x = \emptyset \text{ tr.} \times 25 \times 10000 \times 40$$

4.2.3 Modifikace plazmy

Pro dosažení cílové koncentrace 3×10^8 trombocytů/mL se naředí PRP s využitím PPP, případně fyziologickým roztokem. Trombocyty v PRP mají tendenci se shlukovat. Do zkumavky se z tohoto důvodu přidala apyráza, enzym inhibující shlukování trombocytů. Přidala se v takovém množství, aby v celkovém objemu PRP zaujímala koncentraci 0.02 IU/mL .

4.2.4 Příprava roztoků činidel

Podle typu experimentu se zhotovily roztoky AK nebo kolagenu a dalších činidel v koncentracích uvedených v **Tab. 3**.

Tab. 3: Činidla a jejich koncentrace, které jsou potřebné k experimentu. C1 značí koncentraci roztoků, kterou činidla zaujmají v celkovém objemu mikrokyvety, tedy ve 200 μL . C2 jsou koncentrace roztoků, které je potřeba připravit. Po napipetování 10 μL C2 roztoků do mikrokyvety budou v celkovém objemu 200 μL činit C1.

Fascaplysin [μM]		Kolagen [$\mu\text{g}/\text{mL}$]		Kys. arachidonová [mM]		DMSO [%]	
C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
100	2000	10	200	0.75	15	0.1	2
75	1500	5	100	0.5	10		
50	1000	2.5	50	0.25	5		
25	500	1.25	25	0.125	2.5		
10	200	0.625	12.5				
1	20	0.3125	6.25				
0.1	2						

Roztoky AK (ASPI test) se zhotovily z lyofilizovaného obsahu přidáním 1000 μL dH_2O . Rozpuštěním vznikl roztok o koncentraci 15 mM. Před i po rekonstituci se ASPI test uchovává při teplotě 2–8 $^{\circ}\text{C}$, přičemž stabilita roztoku je jen 24 hodin. Při uchovávání v mrazu od -15 do -25 $^{\circ}\text{C}$ je AK stabilní 4 týdny (Diapharma 2018).

Roztoky kolagenu jsou připravovány z lyofilizátu přidáním 500 μL dH_2O , čímž se získá koncentrace zásobního roztoku 1 mg/mL . Uchovávání lyofilizátu i roztoku je při teplotě 2–8 $^{\circ}\text{C}$. Stabilita roztoku je v tomto případě 4 týdny, při pokojové teplotě jen 24 hodin (HYPHEN BioMed 2021).

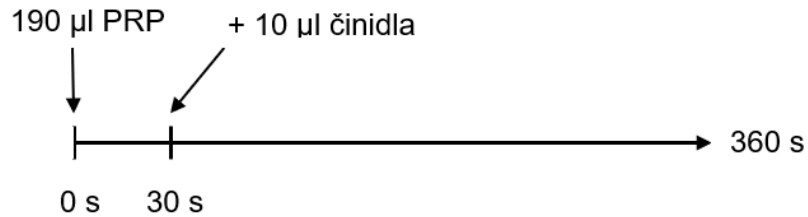
4.2.5 Turbidimetrická agregometrie

Měření a vyhodnocení výsledků proběhlo na agregometru Apact 4004 (DiaSys, Holzheim, Německo). Jedná se o poloautomatický čtyřkanálový přístroj navržený pro měření agregace trombocytů z PRP. Měření je založené na principu turbidimetrie. Mikrokyvetou, s magnetickým míchadlem pro zajištění homogenizace, prochází světlo o velikosti 740 nm. Po zapnutí agregometru se přístroj vytemperuje na teplotu $37.4\text{ °C} \pm 0.3\text{ °C}$.

Každý vzorek PRP od dárce byl podroben analýze zahrnující pozitivní kontrolu a ověření, zda DMSO 0.1% a faspaplysin nemá vliv na agregaci trombocytů. Následovala analýza PRP s preinkubací s faspaplysinem za přítomnosti agregačního činidla. Měření probíhalo pro ověření spolehlivosti minimálně v duplikátech.

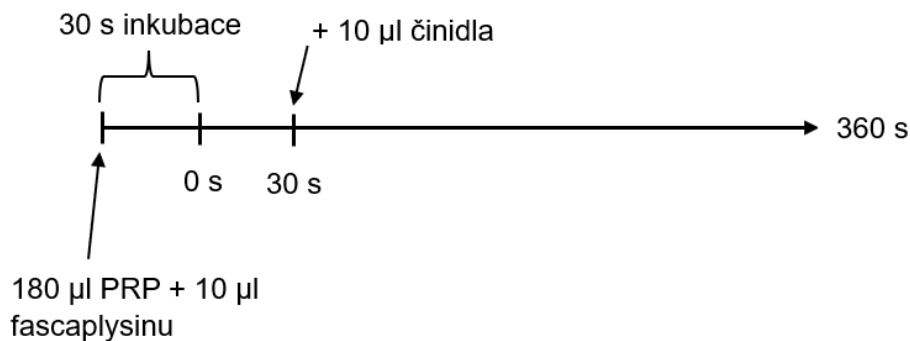
Pozitivní kontrola se uskutečnila s cílem ověřit, že daný experiment je schopen detekovat požadovaný jev a případně zabránit falešně negativnímu výsledku. Podle typu experimentu byla volena AK nebo kolagen. Před měřením na přístroji bylo vyžadováno vytemperování agregometru na 37.4 °C . Zjistila se průchodnost světla v mikrokyvetě u PPP a následně u PRP. Po získání referenčních hodnot započala analýza napipetováním 190 μL PRP do mikrokyvety. Umístěním do agregometru se spustilo měření. Po vyčkání 30 vteřin se k PRP přidalo 10 μL činidla k indukci agregace. Měření se ponechalo puštěné do samovolného zastavení, tedy po dobu 360 vteřin. Bylo potřeba změřit agregaci u všech připravených koncentrací agregačního činidla (**Obr. 16**).

Cílem hodnocení DMSO 0.1% a faspaplysinu v užívaném spektru koncentrací bylo ověření, zda samotné látky neovlivňují výsledky experimentu. Postup probíhal stejným způsobem jako pozitivní kontrola.



Obr. 16: Schéma měření agregace na agregometru Apact 4004 využívané pro pozitivní kontrolu experimentu a pozorování vlivu DMSO 0.1% a faspaplysinu bez induktoru agregace na agregaci krevních destiček. Činidlo = AK, kolagen, DMSO, faspaplysin.

Při zkoumání vlivu faspaplysinu na trombocyty za přítomnosti agregačního činidla se do kyvet napipetovalo 180 µL PRP. Následovalo přidání 10 µL roztoku faspaplysinu. V ten moment se na agregometru zapnula inkubace na 30 sekund. Po uplynutí této doby byla inkubace vypnuta a spustilo se měření. V čase 30 vteřin se do mikrokyvety napipetovalo 10 µL AK či kolagenu. Měření probíhalo až do samovolného ukončení po 360 sekundách (**Obr. 17**).



Obr. 17: Schéma měření agregace na agregometru Apact 4004 využívané pro experimentální hodnocení vlivu faspaplysinu na agregaci trombocytů s induktorem agregace AK nebo kolagenu. Činidlo = AK, kolagen.

4.3 Koagulační kaskáda

Vliv faspaplysinu na koagulační kaskádu byl hodnocen pomocí poloautomatického koagulometru Ceveron four (Technoclone, Vídeň, Rakousko). Mezi sledované parametry patřil aPTT, PT a TT. Tento koagulometr funguje na základě mechanické detekce sraženiny v jednorázových kyvetách. Každá kyveta obsahuje

ocelovou kuličku, která během měření rotuje. Pokud v průběhu měření vznikne sraženina, kulička je zachycena a čas je zaznamenán koagulometrem.

Práce probíhala s lyofilizovanou plazmou (Technoclone Coagulation Control Normal[®]) připravenou z citrátové plazmy zdravých dárců obsahující veškeré koagulační parametry. Tato plazma se před rekonstitucí skladuje při teplotě 2–8 °C. Po rekonstituci přidáním 1 mL dH₂O je plazma stabilní po dobu 8 hodin při teplotě 2–8 °C nebo 4 hodiny při pokojové teplotě. Je možné zmrazení při méně jak – 20 °C na 1 měsíc (Diapharma 2022a).

Všechny zmíněné parametry byly podrobeny třem měřením, přičemž každý krok byl změřen minimálně v duplikátu.

4.3.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

aPTT sleduje vnitřní cestu koagulační kaskády. Látky potřebné pro tento test zahrnují roztok plazmy Coagulation Control Normal, Dapttin[®] TC a Technoclone Calcium Chlorid 25 mmol/l (chlorid vápenatý, CaCl₂). Dapttin obsahuje kromě silic a sulfatidů purifikované fosfolipidy. Je dodáván ve formě lyofilizátu určeného k rekonstituci. Uchovává se při teplotě 2–8 °C. Po rozpuštění se skladuje při teplotě 4 °C po dobu až 15 dní nebo 6 měsíců při – 20 °C (Diapharma 2016a). CaCl₂ je dodáván ve formě roztoku 25 mmol/l. Uchovává se při teplotě 2–8 °C. Po otevření se udržuje při stejné teplotě se stabilitou po dobu 8 týdnů (Diapharma 2022b). Jmenovaná činidla potřebná pro tento test musela být předem vytemperované na teplotu 37 °C, což bylo provedeno na příslušných pozicích pro reagentia na koagulometru.

Analýza zahrnovala nejprve zjištění aPTT u čisté plazmy. Dále bylo nutné ověřit, zda DMSO 0.1% neovlivňuje koagulaci. Jako antikoagulans, který je schopný inhibovat koagulační kaskádu, byl použit heparin. Posledním krokem bylo otestování vlivu faspaplysinu na vnitřní cestu koagulační kaskády.

Test se zahájil napipetováním 100 µL plazmy (37 °C) do kyvety s ocelovou kuličkou. Bezprostředně poté se přidalo 100 µL roztoku Dapttinu (37 °C). Po přidání se na koagulometru spustil odpočet inkubace 2 minuty. Po uplynutí 120. vteřiny se do kyvety aplikovalo 100 µL CaCl₂ (37 °C). Spustilo se měření a uvedený čas vzniku koagulátu se zaznamenal (**Obr. 18**). V případě pozitivní kontroly heparinem

či zkoumání vlivu DMSO 0.1% nebo faspaplysinu na koagulaci byly látky přidávány v prvním kroku do kyvety již předem smíšené v požadovaných koncentracích s roztokem plazmy.



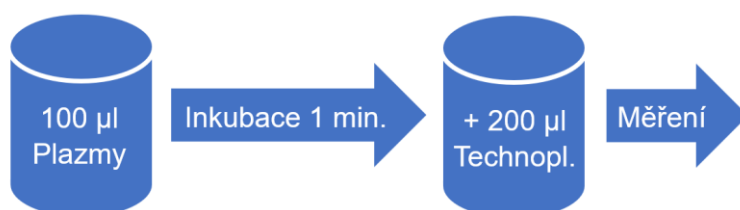
Obr. 18: Schéma postupu při měření aPTT na koagulometru Ceveron four.

4.3.2 Protrombinový čas (PT)

PT monitoruje vnější cestu koagulační kaskády při použití činidla Technoplastin HIS. Neotevřené činidlo se uchovává při teplotě 2–8 °C po dobu expirace uvedenou od výrobce na etiketě. Po otevření se uchovává při teplotě 2–8 °C po dobu 6 dní s možností zmrazení při – 20 °C na 2 měsíce (Diapharma 2016b). Plazma i Technoplastin musejí při měření dosahovat teploty 37 °C.

Měření obnášelo opět stanovení PT u čisté plazmy. Následovalo stanovení času do vzniku sraženiny za přítomnosti heparinu jako pozitivní kontroly a DMSO 0.1%. V posledním kroku se zkoumal PT u plazmy s faspaplysinem jako potenciálním inhibítorem koagulace.

Měření spočívalo v napipetování 100 µL plazmy (37 °C) do kyvety s ocelovou kuličkou. Ihned po přidání se spustilo měření inkubace po dobu 1 minuty. Posledním krokem bylo aplikování 200 µL Technoplastinu HIS (37 °C) do kyvety. Po jeho přidání se spustilo měření na koagulometru a výsledný čas se zaznamenal (**Obr. 19**).



Obr. 19: Schéma postupu při měření PT na koagulometru Ceveron four.

4.3.3 Trombinový čas (TT)

TT monitoruje společnou cestu koagulační kaskády, konkrétně aktivitu trombinu. Nerekonstituovaný lyofilizovaný obsah se uchovává při teplotě 2–8 °C po dobu uvedenou na etiketě. Po rozpuštění lyofilizované reagentie v 6 mL dH₂O se uchovává při teplotě 12 °C po dobu 24 hodin nebo 1 měsíc při teplotě – 20 °C (Diapharma 2016c). Na rozdíl od předchozích hodnocených testů je zde nutné, aby teplota činidel dosahovala pokojové teploty.

Před hodnocením ovlivnění TT faspaplysinem byl změřen čas u čisté plazmy, DMSO 0.1% a heparinu. Měření spočívalo v aplikaci 200 µL plazmy (pokojová teplota) do jednorázové kyvety v koagulometru. Následovala inkubace na 1 minutu a v 60. vteřině byl přidán Thrombin Reagent (pokojová teplota) v objemu 200 µL. Získaný čas na koagulometru se zaznamenal (**Obr. 20**).



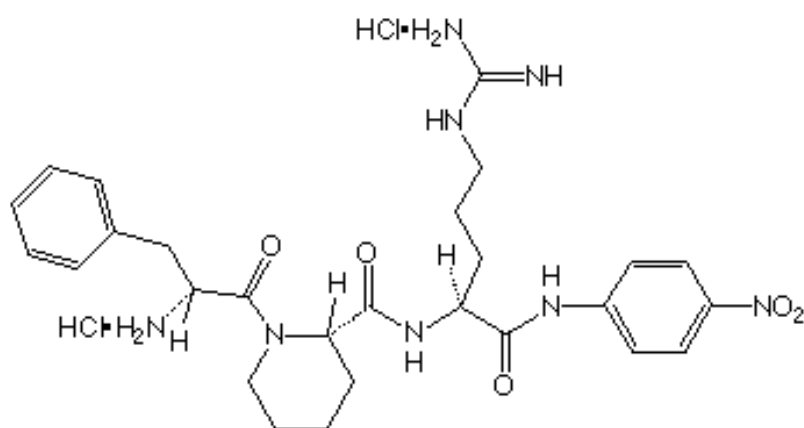
Obr. 20: Schéma postupu při měření TT na koagulometru Ceveron four.

4.4 *In vitro* hodnocení aktivity trombinu a faktoru Xa pomocí chromogenních substrátů

Zde se pomocí specifických *in vitro* testů s využitím chromogenních substrátů hodnotil vliv na významné faktory koagulační kaskády, a to na trombin a FXa. Chromogenní substráty jsou bezbarvé nebo téměř bezbarvé látky, které se enzymatickou reakcí mění na látky výrazného zbarvení. Vznikající produkty způsobují v přítomnosti enzymu změnu absorbance záření procházejícího vzorkem. Změna absorbance byla detekována readerem Hidexu (Hidex, Turku, Finsko). Jedná se o přístrojové vybavení schopné detekce na základě fotometrie, fluorimetrie a luminiscence.

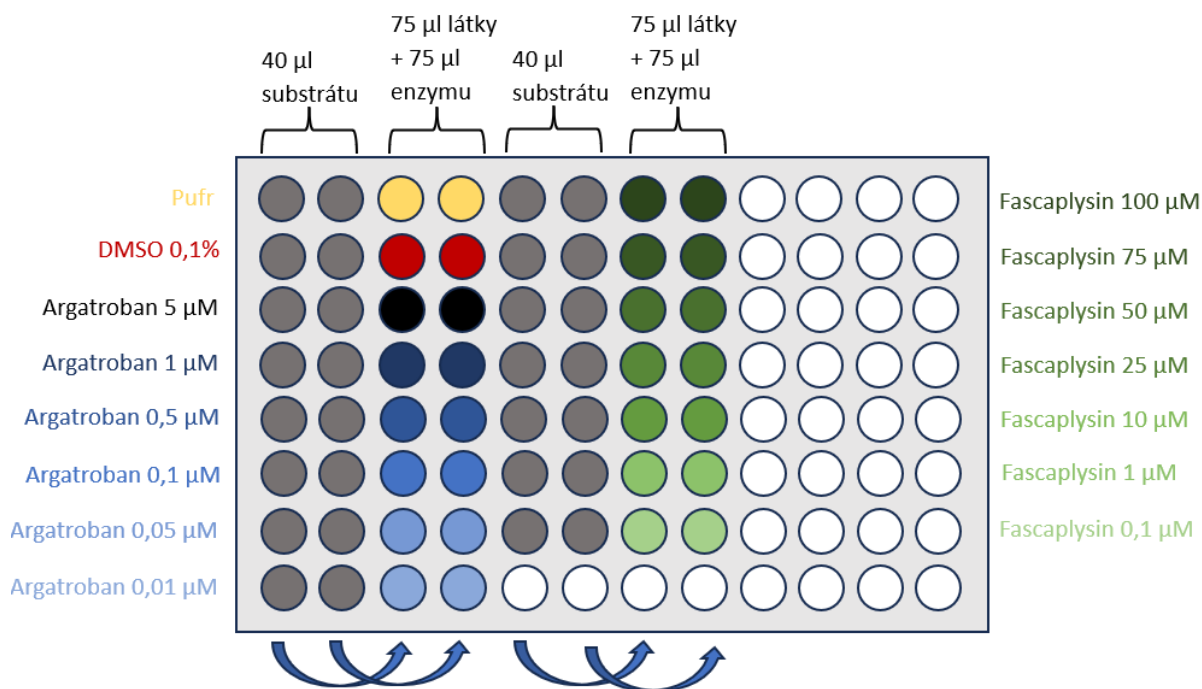
4.4.1 Chromogenní substrát pro trombin

Chromogenní substrát Chromogenix S-2238 pro trombin je molekula složená z aminokyselin spojené peptidovou vazbou a z p-nitroanilinu tvořící amid s karboxylovou skupinou aminokyseliny argininu (**Obr. 21**). Za přítomnosti enzymu trombinu dochází k uvolnění p-nitroanilinu a tím ke zvýšení absorbance při vlnové délce 405 nm.



Obr. 21: Chemická struktura substrátu S-2238 pro trombin. Převzato z: Diapharma, Chromogenic substrates.

Substance užitá v této metodě byly S-2238, trombin, TBS pufr, DMSO, antikoagulans argatroban a fascaplysin. Metoda proběhla na 96-jamkové mikrotitrační destičce a způsob, jakým byly látky aplikovány na destičku, včetně jejich objemů a koncentrací, je zobrazen na **Obr. 22**.



Obr. 22: Schéma mikrotitrační destičky před inkubací v Hidexu. Barvy jednotlivých jamek přísluší stejně zbarvených popiskům. Šipky značí směr pipetování substrátu po inkubaci v Hidexu.

TBS pufr se složení 50 mM Tris + 150 mM NaCl a pH 7.4 byl užit jako vehikulum analyzovaných látek, a proto byl součástí měření jako blank.

S-2238 je dodáván ve formě lyofilizovaného obsahu a při teplotě 2–8 °C je stabilní po dobu expirace uvedené na etiketě od výrobce. Jeho roztok s dH₂O si při teplotě 2–8 °C zachovává své vlastnosti 6 měsíců (Diapharma 2016d). Trombin 100 IU/mL byl skladován v alikvotech při teplotě –20 °C.

Metoda spočívá v nanesení substancí do mikrotitrační destičky takovým způsobem, aby se před měřením absorbance přemístil substrát multikanálovou pipetou směrem, jaký je znázorněn šipkami na **Obr. 22**. V této chvíli tvořila jamka se všemi substancemi objem 190 µL. Tato hodnota byla důležitá pro výpočty koncentrací činidel, které je potřeba připravit.

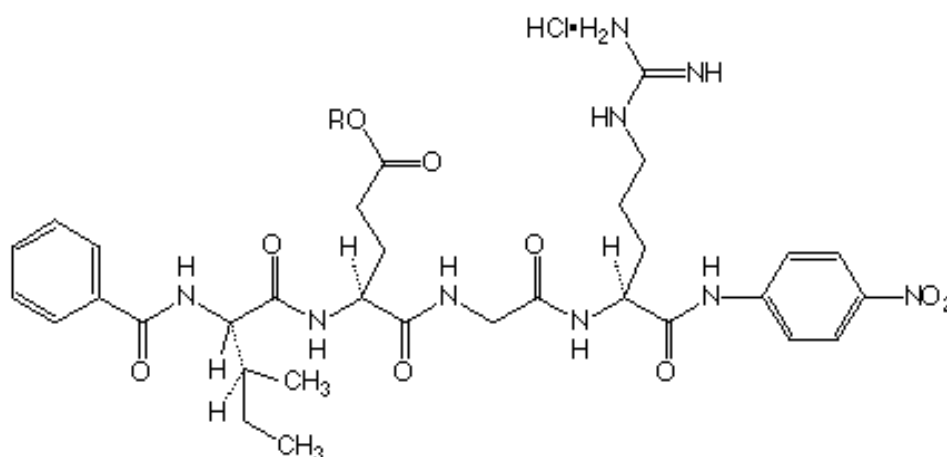
Připravené koncentrace roztoků se tedy automatickou pipetou aplikovaly do jednotlivých jamek po duplikátech. Do dvou sloupců jamek byl aplikován samotný substrát pro trombin S-2238 o objemu 40 µL. Substrát byl přidáván v koncentraci 1.78 mM, čímž se v celkovém množství 190 µL dosáhlo koncentrace 0.375 mM.

Následně se do vedlejších dvou sloupců jamek umístily po duplikátech jednotlivé látky po 75 μL , tj. pufr, DMSO 0.1%, argatroban a fascaplysin v zobrazených koncentracích. Do těchto jamek byl následně přidán také enzym trombin, nicméně k tomu došlo až bezprostředně před začátkem inkubace mikrotitrační destičky v Hidexu. Výpočtem bylo zjištěno, že je potřeba připravit roztok trombinu o koncentraci 1.9 IU/mL, aby finální koncentrace enzymu ve 190 μL byla 0.75 IU/mL.

Pro měření musí zařízení Hidexu dosahovat teploty 37.3 °C. Po splnění tohoto požadavku, včetně správně nastavených podmínek vlnové délky a intervalech detekce, se do jamek s látkou aplikuje 75 μL trombinu. Poté se vložila destička do Hidexu za účelem inkubace po dobu 10 minut. S uplynutím tohoto času se na vyjmuté destičce z Hidexu přemístil pomocí multikanálové pipety obsah jamek se substrátem do jamky s látkou a enzymem trombinem. Destička se poté vložila zpět do Hidexu. Podle předem nastaveného programu se měří absorbance každou minutu (30 cyklů) při 405 nm. Celkem byly provedeny tři měření.

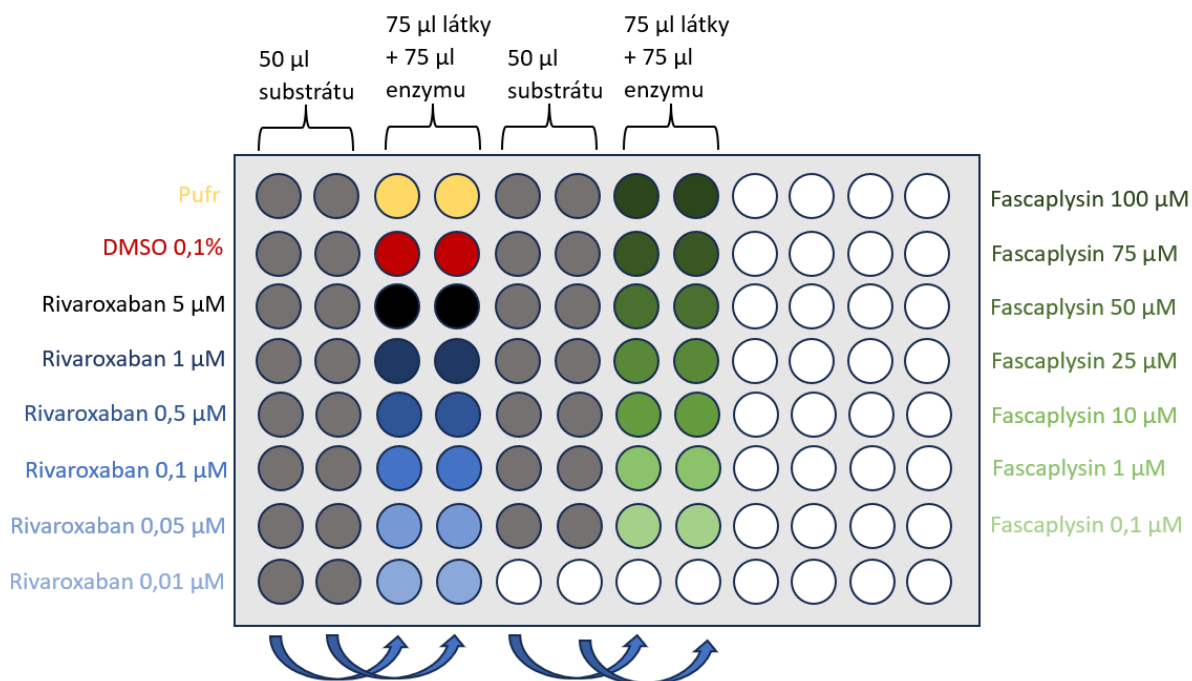
4.4.2 Chromogenní substrát pro faktor Xa

Pro hodnocení aktivity FXa slouží substrát Chromogenix S-2222. Struktura obsahuje rovněž aminokyseliny a působením FXa dojde k oddělení p-nitroanilinu (**Obr. 23**). Tento jev se projeví zvýšením absorbance záření vlnové délky 405 nm.



Obr. 23: Chemická struktura substrátu S-2222 pro FXa. Převzato z: Diapharma, Chromogenic substrates.

Mezi užité substance patří S-2222, FXa, pufr, DMSO, antikoagulans rivaroxaban a faspaplysin. Způsob přípravy mikrotitrační destičky je znázorněn na **Obr. 24**.



Obr. 24: Schéma přípravy roztoků do mikrotitrační destičky před inkubací v Hidexu. Barvy jednotlivých jamek patří ke stejné zbarveným popiskům. Šipky značí směr pipetování substrátu po inkubaci v Hidexu.

Vehikulum tvořil pufr se složením 150 mM Tris + 150 mM NaCl + 7.5 mL EDTA s pH 7.4. Zároveň plnil funkci blanku.

S-2222 je v podobě lyofilizátu skladovaný při teplotě 2–8 °C. Při stejných podmínkách je skladovaný po rekonstituci dH₂O až po dobu 6 měsíců (Diapharma 2016e). FXa byl uchováván v alikvotech při –20 °C.

Stejně jako v předchozím testu u substrátu pro trombin, byl do dvou vedle sebe ležících sloupců jamek pipetován S-2222. Nicméně tentokrát je jeho objem 50 µL a tím se celkový objem jamky po smísení veškerých složek dostal na 200 µL. Cílem substrátu bylo dosáhnout v tomto objemu 200 µL koncentrace 0.8 mM. Byl proto připraven roztok substrátu s koncentrací 3.2 mM. Vedlejší dva sloupce náležely 75 µL látky, tj. pufr, DMSO 0.1%, rivaroxaban a faspaplysin a 75 µL FXa přidaného opět

až bezprostředně před inkubací v Hidexu. Zde byl připraven roztok FXa o koncentraci 5.3 IU/mL, čímž v celkovém objemu 200 μ L bude tvořit 2 IU/mL.

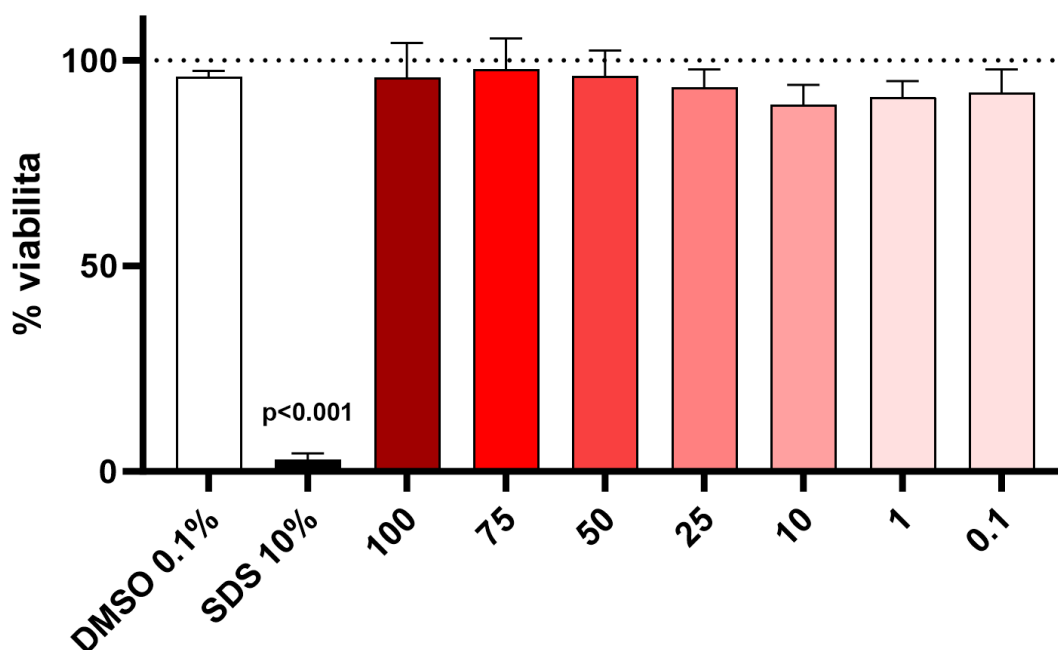
Po dosažení teploty 37.3 °C na Hidexu se doplnil do jamek s látkami 75 μ L enzymu Xa. Následovala inkubace destičky v Hidexu pouze na 1 minutu. Po uplynutí této doby se multikanálovou pipetou přemístil obsah jamek se substrátem do roztoku látky s enzymem podle šipek na schématu. Destička se umístila do Hidexu a spustilo se měření. Absorbance při vlnové délce 405 nm byla měřena každou minutu v celkovém počtu 30 cyklů. Celkem byly provedeny tři měření.

5 VÝSLEDKY

5.1 Cytotoxická aktivita

V první části této práce byla podrobena analýze viabilita trombocytů lidské PRP od zdravých dárců po inkubaci s faspaplysinem. Metodou s MTS byly testovány takové koncentrace faspaplysinu, které byly využity ve všech experimentech, tedy od 0.1 do 100 μM . Součástí testu bylo hodnocení cytotoxické aktivity také DMSO 0.1%, který sloužil jako rozpouštědlo a vehikulum testovaného alkaloidu a SDS 10% v roli pozitivní kontroly.

Testované koncentrace faspaplysinu zahrnovaly i značně vysoké koncentrace, neboť antineoplastický účinek alkaloidu vyvolává pochybnosti ohledně jeho bezpečnosti. Avšak výsledky ukázaly, že žádná z testovaných koncentrací faspaplysinu nevykazovala cytotoxickou aktivitu na trombocyty, a to ani v té nejvyšší koncentraci 100 μM . Viabilita buněk se pohybovala u hranice 100 % také u DMSO 0.1%. Pozitivní kontrola SDS 10% byla prokazatelně toxická na lidské trombocyty, kde došlo k úplnému usmrcení buněk (**Obr. 25**).

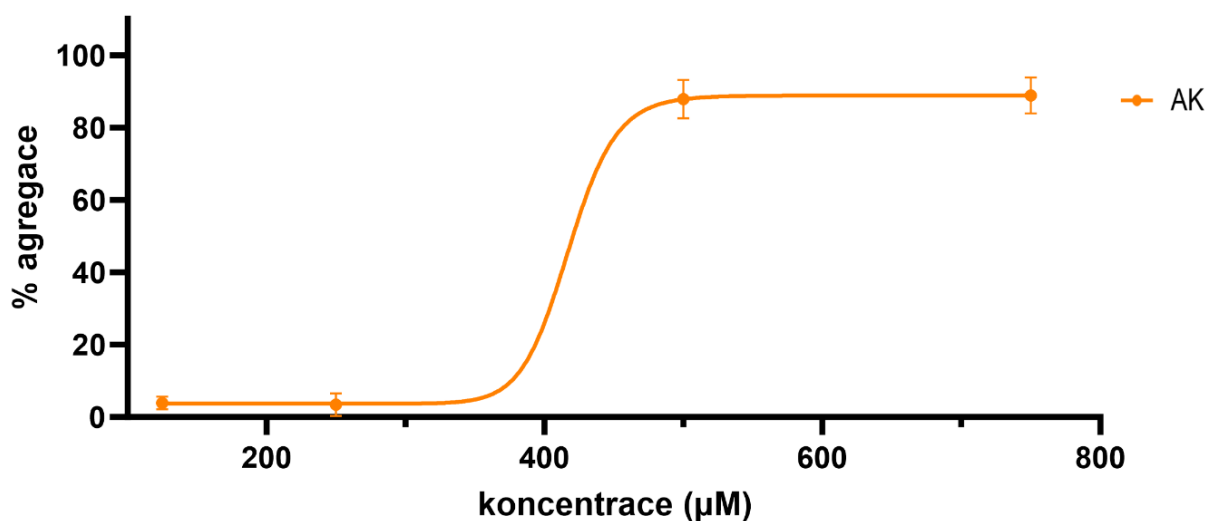


Obr. 25: MTS assay hodnocení cytotoxicity faspaplysinu. Graf zobrazuje viabilitu trombocytů po inkubaci s faspaplysinem, DMSO 0.1% a SDS 10%. Statistická analýza:

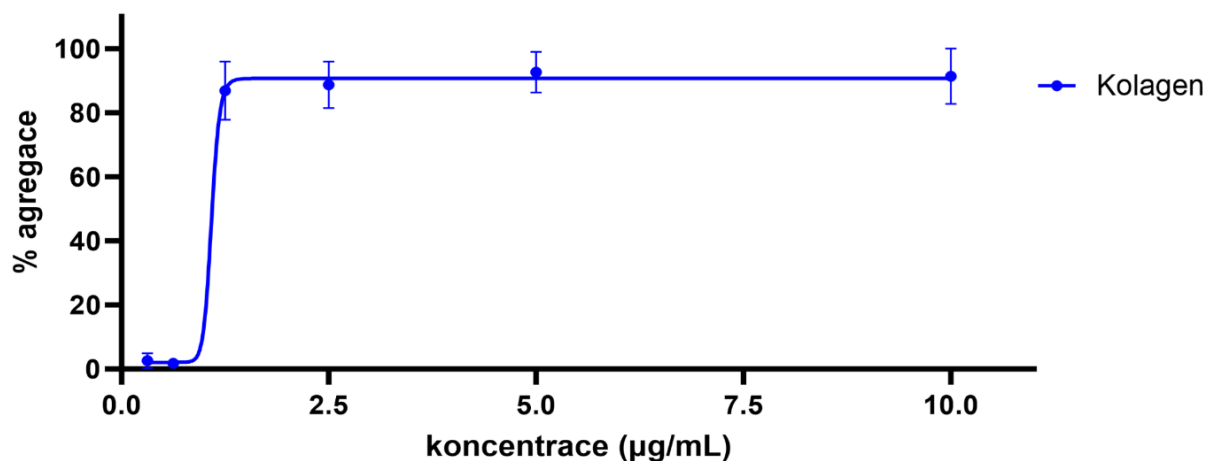
One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison post-hoc test. Výsledky jako průměr hodnot tří dárců provedených v triplicátech.

5.2 Agregace trombocytů

V druhé části práci byl analyzován vliv faspaplysinu na agregaci trombocytů. Test proběhl s využitím plazmy od 10 zdravých dárců. Separovaná PRP byla nejprve podrobena pozitivní kontrole (**Obr. 26, Obr. 27**). Pro tyto účely byly připraveny stanovené koncentrace AK nebo kolagenu a minimálně v duplikátech změřené na agregometru. Typ agregačního činidla závisel na zařazení dárce do skupiny. Lze pozorovat, jak se zvyšující se koncentrací roztoku agregačních činidel došlo k indukci agregace trombocytů. Tyto výsledky posloužily ke zvolení koncentrace, které poskytuje maximální agregaci trombocytů. Vybraná koncentrace byla dále využita do hodnocení s preinkubací s faspaplysinem. U AK byla zvolena koncentrace 750 μM a u kolagenu 1.25 $\mu\text{g/mL}$. Tyto koncentrace činidel indukovaly maximální agregaci u PRP každého dárce.

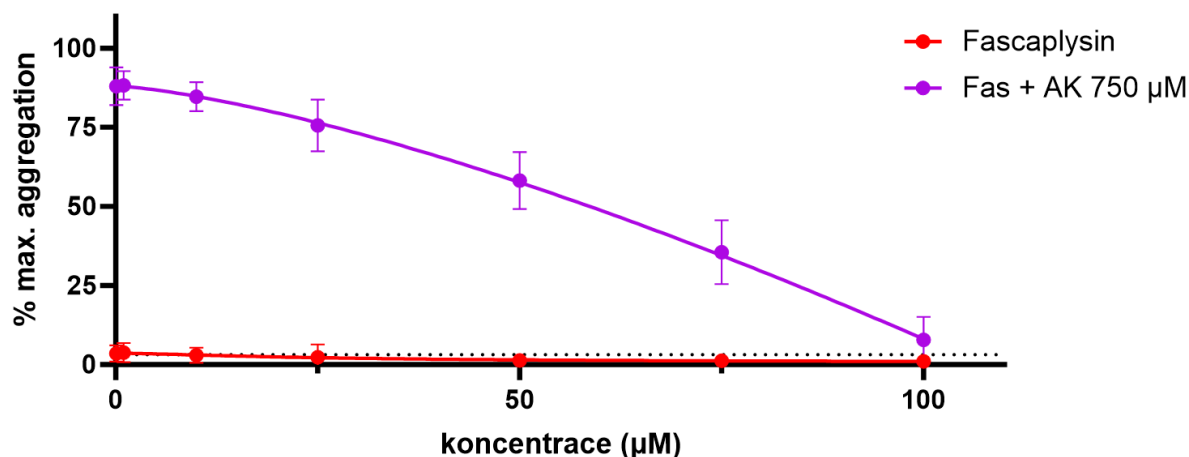


Obr. 26: Výsledky pozitivní kontroly agregace trombocytů. Testována byla AK v koncentracích 125–750 μM . Výsledky jako průměr hodnot pěti dárců, provedených minimálně v duplikátech.



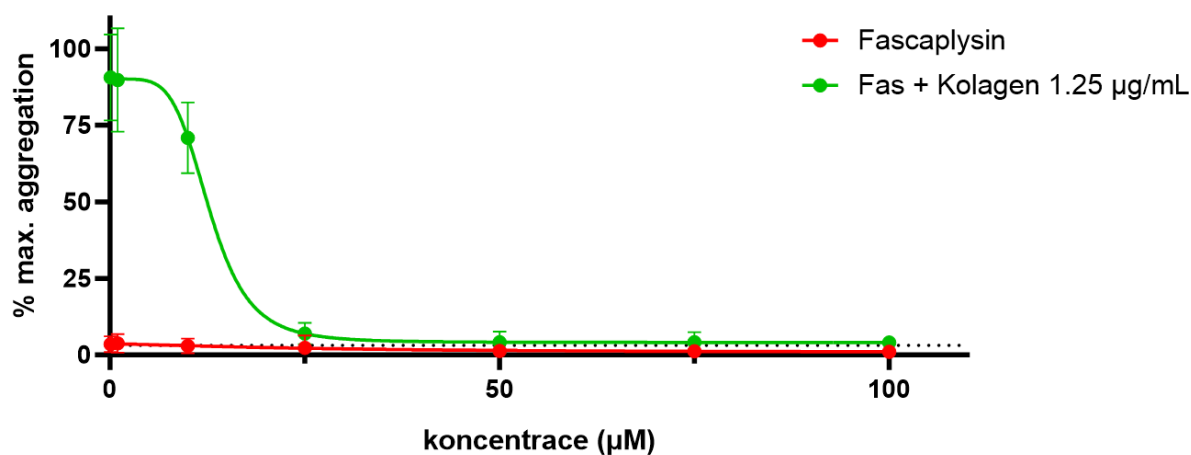
Obr. 27: Výsledky pozitivní kontroly agregace trombocytů. Testován byl kolagen v koncentracích 0.3125–10 µg/mL. Výsledky jako průměr hodnot pěti dárců, provedených minimálně v duplikátech.

Následující graf zobrazuje v první řadě výsledky ovlivnění agregace trombocytů za použití AK s preinkubací s fascaplysinem. Společně je na grafu znázorněn výsledek vlivu samotného fascaplysinu na agregaci (**Obr. 28**). Křivka fascaplysinu v celém spektru testovaných koncentrací nevykazuje ovlivnění agregací aktivity. Prolíná se s blankem, hodnotou získanou změřením DMSO 0.1% v PRP, znázorněného tečkovanou křivkou. Fialově značená křivka zobrazuje ovlivnění agregace trombocytů za přidavku AK 750 µM a s preinkubací s fascaplysinem. Inhibice aktivity trombocytů je závislá na koncentraci fascaplysinu. Mírná inhibice nastala při koncentraci 10 µM. Téměř úplné inhibice agregace trombocytů indukovanou AK se podařilo dosáhnout až při nejvyšší testované koncentraci fascaplysinu 100 µM.



Obr. 28: Výsledky ovlivnění agregace trombocytů u PRP dárců za použití AK 750 µM s preinkubací s fascaplysinem. Výsledky jako průměr hodnot pěti dárců, provedených minimálně v duplikátech.

Vyšší účinnost lze pozorovat u činidla kolagenu (**Obr. 29**). Inhibice aktivity trombocytů za přítomnosti kolagenu v koncentraci 1.25 µg/mL byla pozorována již v nízkých koncentracích fascaplysinu. Od koncentrace 10 µM byla viditelná částečná inhibice agregace. U koncentrací vyšších než 25 µM došlo ke 100% inhibici agregace destiček.

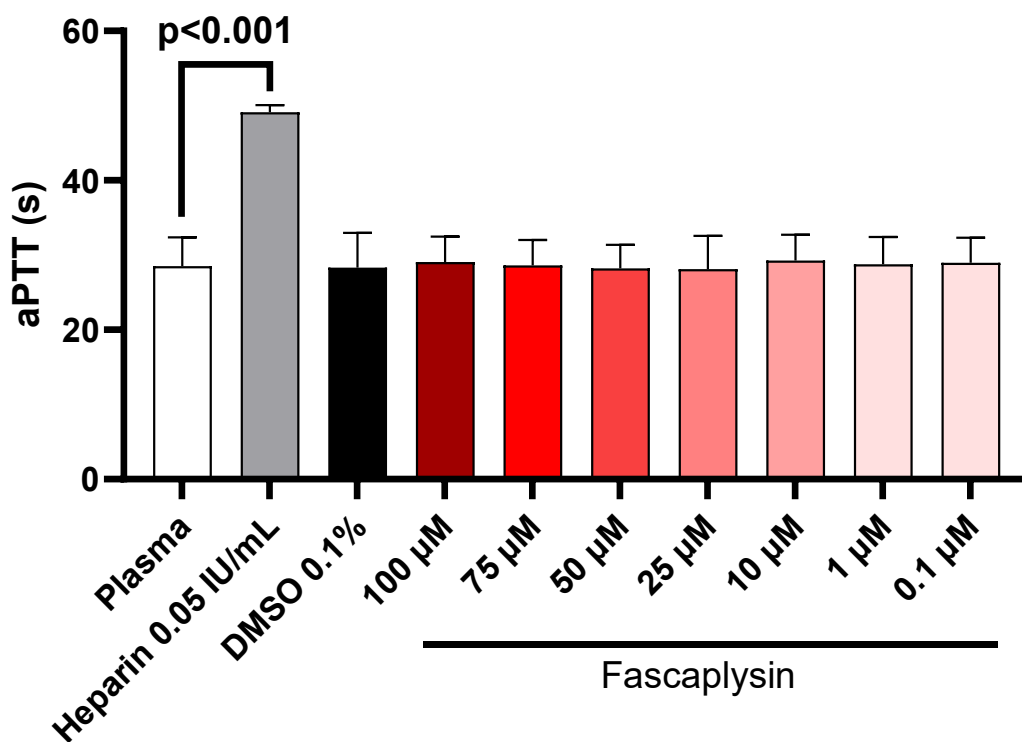


Obr. 29: Výsledky ovlivnění agregace trombocytů u PRP dárců za použití kolagenu 1.25 µg/mL s preinkubací s fascaplysinem. Výsledky jako průměr hodnot pěti dárců, provedených minimálně v duplikátech.

5.3 Koagulační kaskáda

Vliv fascaplysinu na koagulační kaskádu byl analyzován pomocí koagulometru Ceveron Four. Na místo plazmy byla užitá lyofilizovaná Coagulation Control Normal. Spolu s dalšími aditivami specifickými pro daný test byly vyhodnoceny aPTT, PT a TT. Toto měření zahrnovalo stanovení času vzniku fibrinové sraženiny v čisté plazmě. Antikoagulancium heparin byl použit jako pozitivní kontrola, zatímco DMSO 0.1% byl zkoumán pro ověření neutrálního vlivu na koagulaci krve. Následně byla hodnocená plazma smíšená s fascaplysinem do cílových koncentrací od 0.1 μM do 100 μM .

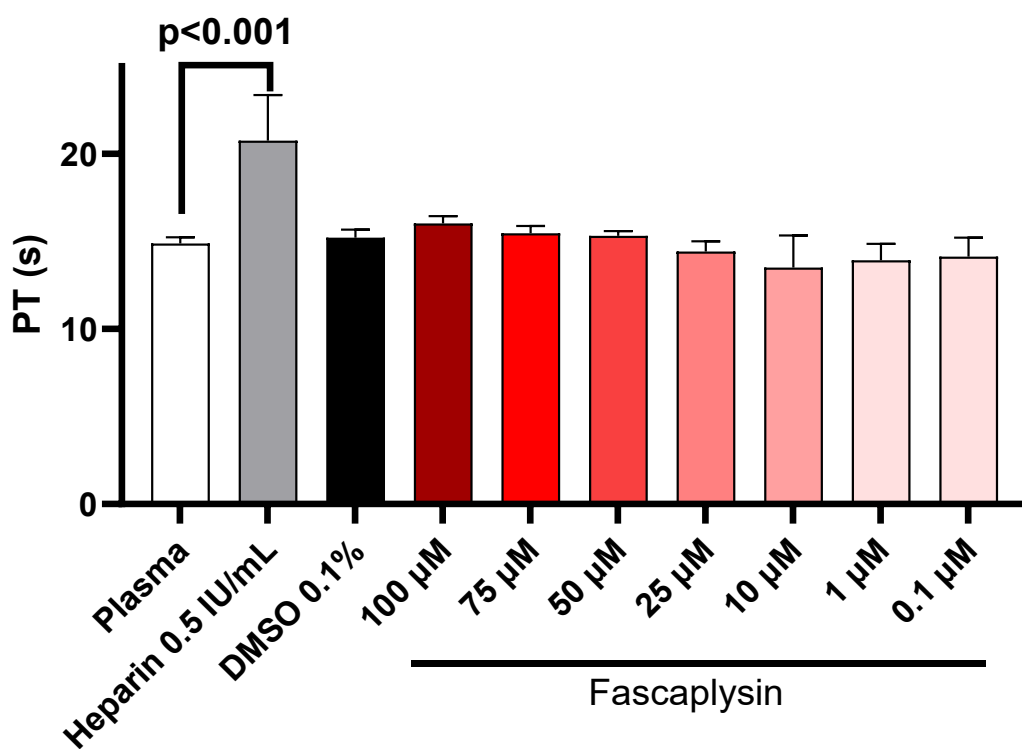
Vliv na zmíněné koagulační parametry se podle provedených testů neprojevil jako významný. U aPTT nebylo pozorováno významné ovlivnění parametru při porovnání čisté plazmy a plazmy s fascaplysinem (**Obr. 30**). Referenční hodnoty aPTT jsou 29-42 s. Zde byl zjištěn průměr aPTT čisté plazmy na 29 s (Diapharma 2016a). U heparinu 0.05 IU/mL došlo k téměř zdvojnásobení času vzniku fibrinové sraženiny, což potvrdilo schopnost plazmy poskytovat očekávané výsledky. Černě znázorněný DMSO 0.1% neprokázal žádný vliv na aPTT.



Obr. 30: Výsledky ovlivnění aPTT fascaplysinem. U fascaplysinu a DMSO 0.1% neprokázán vliv na aPTT. Statistický test one-way ANOVA, Dunnett's multiple

comparison post-hoc test. Výsledky jako průměr ze tří měření provedených minimálně v duplikátech.

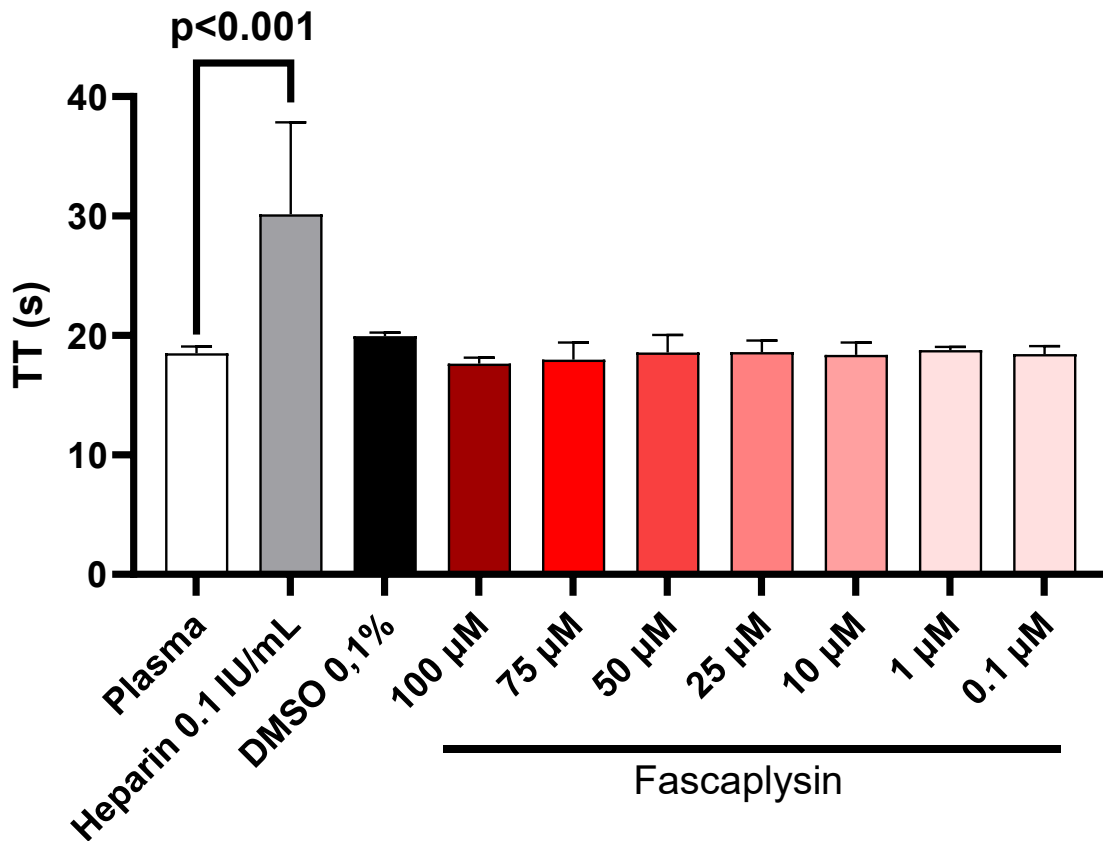
Další provedený test zahrnoval PT. Stejně jako v předchozím případě byl stanoven referenční čas samotné plazmy. Porovnání PT u plazmy bez a s přidavkem fascaplysinu neprokázalo statisticky významné změny v čase vzniku koagulátu (**Obr. 31**). PT plazmy spadal s časem necelých 15 s do fyziologického rozmezí 13-17 s (Diapharma 2016b). Fascaplysin 100 μM prodloužil čas vzniku sraženiny na 16 s, nejedná se však o významné působení. Heparin v koncentraci 0.5 IU/mL vykazoval očekávané zvýšení PT. DMSO 0.1% opět neovlivnil sledovaný parametr.



Obr. 31: Výsledky ovlivnění PT fascaplysinem. U fascaplysinu a DMSO 0.1% neprokázán vliv na PT. Statistický test one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison post-hoc test. Výsledky jako průměr ze tří měření provedených minimálně v duplikátech.

Poslední provedený test se týkal TT. Výsledky tohoto testu se shodovaly se závěry předchozích koagulačních parametrů, tzn. nebyl zaznamenán rozdíl mezi TT kontrolní plazmy a plazmy s fascaplysinem (**Obr. 32**). U plazmy byl naměřen TT 18.5 s,

spadal tedy do fyziologické hodnoty, která je definována hodnotou <22 s (Diapharma 2016c). Pozitivní kontrola byla ověřena heparinem o koncentraci 0.1 IU/mL. DMSO 0.1% poskytl obdobné výsledky jako v předchozích testech. U nejvyšší koncentrace faspaplysinu je naopak mírný pokles TT na 17.6 s.

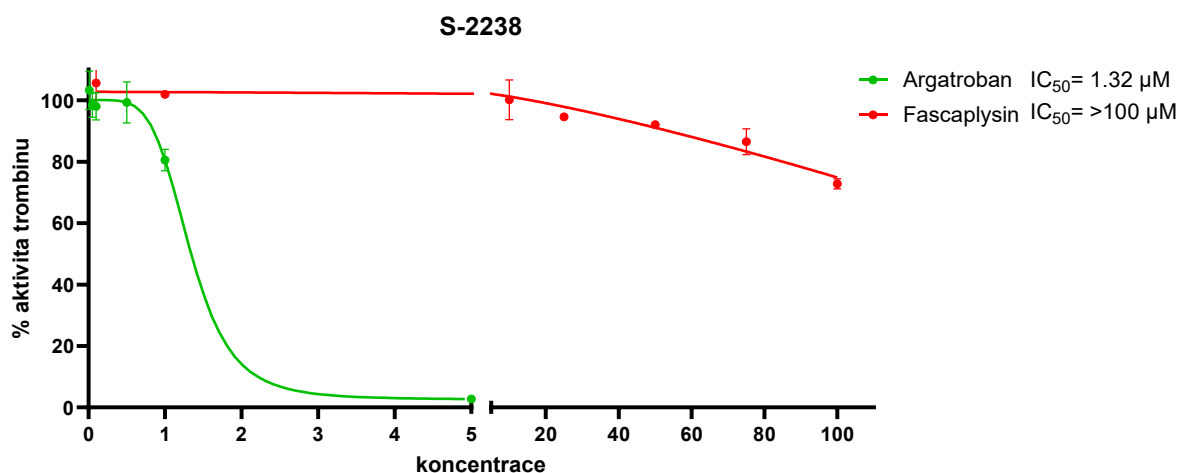


Obr. 32: Výsledky ovlivnění TT faspaplysinem. U faspaplysinu a DMSO 0.1% neprokázán vliv na TT. Statistický test one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison post-hoc test. Výsledky jako průměr ze tří měření provedených minimálně v duplikátech.

5.4 *In vitro* hodnocení aktivity trombinu a faktoru Xa pomocí chromogenních substrátů

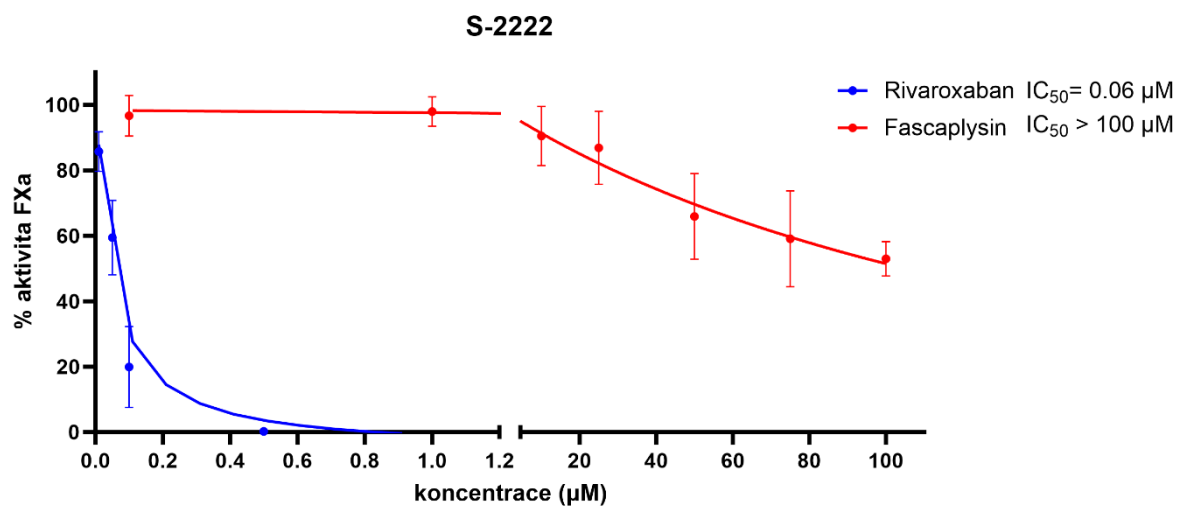
Předešlá část práce popisovala vliv faspaplysinu na koagulační kaskádu. Zde se pomocí specifických *in vitro* testů s využitím chromogenních substrátů hodnotil vliv na významné faktory koagulační kaskády, a to na trombin a FXa.

Na grafu lze pozorovat výsledky u S-2238 pro trombin. Pro porovnání schopnosti faspaplysinu inhibovat trombin byl použit antikoagulans argatroban, přímý inhibitor trombinu. Ve vyšších z testovaných koncentracích inhiboval argatroban aktivitu enzymu a tím zabraňoval uvolnění p-nitroanilinu. Inhibici trombinu od koncentrace 25 μM vykazoval také alkaloid faspaplysin. Nicméně aktivita nebyla příliš významná. Hodnota IC_{50} poskytující informaci o tom, jaká koncentrace faspaplysinu inhibuje 50 % zkoušené látky, v tomto případě trombinu, byla vyšší než 100 μM . Faspaplysinu 100 μM inhiboval aktivitu trombinu o 31 % (**Obr. 33**).



Obr. 33: Výsledky hodnocení inhibici trombinu faspaplysinem. Výsledky jako průměr hodnot ze tří měření měřených v duplikátu.

Výraznější aktivitu prokázal faspaplysin při inhibici FXa, k čemuž sloužil substrát S-2222. Modrou křivkou je znázorněna inhibice FXa rivaroxabanem, přímým inhibitorem tohoto faktoru koagulační kaskády. Faspaplysin vykazuje v porovnání s inhibicí trombinu silnější aktivitu, počínaje koncentrací 10 μM . U nejvyšší koncentrace alkaloidu došlo k inhibici necelých 50 % FXa (**Obr. 34**).



Obr. 34: Výsledky hodnocení inhibici FXa fascaplysinem. Výsledky jako průměr hodnot ze tří měření měřených v duplikátu.

6 DISKUZE

Látky mořského původu tvoří nedostatečně prozkoumanou skupinu chemických sloučenin, které zahrnují potenciálně zajímavé molekuly s mnohými farmakologickými účinky. Některé látky mají již schválené užití k terapii. Mezi známá účinná léčiva patří např. bryostatin, prokazující účinek u neurologických poruch jako je Alzheimerova choroba nebo roztroušená skleróza (Tian et al. 2023). Pro chronickou bolest je schválen zikonotid (Bäckryd 2018). Mořské látky jsou velmi účinné v oblasti protinádorové terapie, což otevírá nové možnosti léčby u tohoto onemocnění s neustále se zvyšující incidencí. Příkladem je eribulin schválený pro terapii karcinomu prsu, dále cytarabin u akutní myeloidní leukémie nebo marizomib a plitidepsin u mnohočetného myelomu. Další látky s antineoplastickým účinkem jsou testovány v klinických studiích (Wu et al. 2021). Významné jsou také antitrombotické vlastnosti izolovaných mořských molekul. Aktivita byla prokázána např. u látek strukturního typu polyfenolů izolovaných z hnědé řasy nebo u makromolekul proteinů a lipidů. Významný je objev dalších látek ze skupiny sulfatovaných glykanů, mezi které patří známý GAG nebo heparin (Dwivedi a Pomin 2020).

Hodnocení ovlivnění agregace trombocytů fascalysinem v této práci bylo provedeno za indukce AK a kolagenu. U obou činidel došlo k inhibici aktivace trombocytů a jejich agregaci, avšak s odlišnou odezvou na použité koncentrace. Za přítomnosti induktoru kolagenu byla plně inhibována agregace při výrazně nižší koncentraci než u experimentu s AK. Dá se očekávat, že v případě provedení dalších experimentů například s ADP nebo trombinem, může být odpověď trombocytů variabilní. Příčinou může být mechanismus, na základě kterého mediátoři aktivují destičky. Kolagen je ligand membránových receptorů GPIa/IIa a GPVI. Zatímco AK je prekurzor TXA₂, který poté působí na membránové receptory TP (Marcucci et al. 2016). Použitá činidla se tedy liší typem receptoru, na které se váží, a způsobem, jakým intracelulární kaskády reakcí vedou k aktivaci destiček provázející změnu tvaru trombocytů, expresi GPIIb/IIIa a uvolnění dalších mediátorů degranulací. Tato skutečnost může vést k variabilitě účinnosti. Avšak přesný mechanismus působení fascalysinu musí být ještě prozkoumán.

Fascalysin a jeho antitrombotické účinky byly krátce zkoumány v práci Ampofo a kol. v roce 2015. Stanovení proběhlo na několikrát promytých trombocytech šesti

dárců. Promyté trombocyty byly s faspaplysinem inkubovány 0.5 hodiny. Ke stimulaci byl použit forbol-12-myristát 13-acetát (PMA), ADP a peptid aktivující proteázu aktivovaného receptoru-1 (PAR-1-AP). V této diplomové práci byla agregace indukovaná AK nebo kolagenem ověřena v relevantních vzorcích PRP zdravých dárců, neboť rozdíl indukované agregace se u promytých destiček a PRP může lišit. Destičky jsou velmi citlivé buňky a veškeré zpracování a manipulace s destičkami může aktivovat spontánní agregaci a výrazně ovlivnit výsledky experimentu. PRP je z toho důvodu více fyziologický vzorek než promyté trombocyty, jaké byly použity v práci Ampofo a kol. a výsledky jsou proto významnější. Obě práce se liší nejen v typu biologického vzorku, ale také v podmínkách přípravy a použitých činidlech k indukci agregace. Výsledky v práci Ampofo a kol. ukázaly inhibici agregace především po přidání ADP, u dalších činidel byla inhibice nižší. Dle výsledků práce faspaplysin 10 μM inhiboval indukci způsobenou ADP 10 μM zhruba na 5 % aktivity destiček, u PAR-1-AP 2.5 μM se snížila aktivita na přibližně 60 %. V této diplomové práci bylo hodnoceno sedm koncentrací faspaplysinu. Jeho schopnost inhibovat agregaci indukovanou AK 750 μM byla výrazná až při vyšších koncentracích. Stejná koncentrace faspaplysinu 10 μM inhibovala agregaci jen mírně. Maximum inhibice nastalo až při koncentraci 100 μM . U indukce agregace kolagenem 1.25 $\mu\text{g/mL}$ byla zjištěna výraznější aktivita faspaplysinu, který při koncentraci 10 μM inhiboval aktivitu destiček na 70 % s maximem inhibice u faspaplysinu 25 μM .

Rozpor vznikl mezi výsledky metod hodnotící antikoagulační aktivitu. V prvním případě byly s využitím lyofilizované plazmy hodnoceny koagulační parametry aPTT, PT a TT. Na koagulometru nebyla detekována statisticky významná změna času vzniku trombu v porovnání se samotnou plazmou. Druhá metoda s chromogenními substráty však prokázala inhibici FXa i trombinu. Aktivita trombinu po inhibici nejvyšší koncentrací faspaplysinu klesla na 70 % s prvními známkami inhibice od 25 μM faspaplysinu. FXa byl lehce inhibován koncentrací 10 μM a nejvyšší testovaná koncentrace faspaplysinu 100 μM způsobila snížení aktivity FXa na 50 %. V případě, že by faspaplysin opravdu ovlivňoval oba faktory koagulační kaskády, jak prokázalo *in vitro* hodnocení, byla by inhibice viditelná na testovaných koagulačních parametrech. Určitý vliv na odlišné výsledky by mohla mít také citlivost metody užitá k detekci koagula. Avšak při měření metody s koagulometrem se pracovalo s lyofilizovanou

plazmou obsahující všechny faktory koagulační kaskády a věrněji tak reflektuje fyziologické podmínky.

Tématem diskuze ohledně faspaplysinu je jistě jeho potenciální cytotoxicita. Stanovení cytotoxicity faspaplysinu u trombocytů v této práci neprokázalo vliv na viabilitu buněk ani při vysoké koncentraci. V práci Ampofo a kol. byla v rámci stanovení cytotoxicity průtokovou cytometrií odhalena cytotoxicita na promyté destičky. Životnost trombocytů dosahovala 80 % po vystavení faspaplysinu 50 μ M. Neshoda výsledků může být z důvodu typů použitého biologického vzorku.

Faspaplysin je prokazatelně toxický vůči nádorovým buňkám. Jeho účinek byl zkoumáný na různých typech nádorových linií. Působí více mechanismy, především ale jako inhibitor kináz. Nebezpečná je ale schopnost faspaplysinu interkalace do DNA u proliferujících buněk vzhledem ke své planární struktuře (Hörmann et al. 2001). Trombocyty jsou bezjaderné útvary, proto by následující testy měly zhodnotit cytotoxicitu faspaplysinu např. na erythrocytech nebo dalších buňkách. Vhodné by bylo sledování proliferace buněk v čase, které lze hodnotit metodou MTS využívající rozpustnou tetrazoliovou sůl, která nijak neovlivňuje životnost buněk. Popřípadě je možností zhodnotit viabilitu trombocytů zmíněnou průtokovou cytometrií.

Účinky faspaplysinu a jeho analogů jsou ve fází zkoumání a vyjmenované experimenty více popisující cytotoxickou a antiagregační aktivitu by měly vést k formování možnosti užití jako potenciálního léčiva. Odhalení a pochopení všech účinků je přínosné také pro znalost vedlejších účinků v případě užívání faspaplysinu jako léčiva. Využití může mít také jako lead structure, kdy se modifikací struktury získávají další analoga.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci se hodnotila schopnost faspaplysinu inhibovat agregaci trombocytů a koagulační systém. Součástí bylo stanovení testu cytotoxicity s PRP, jenž potvrdil, že faspaplysin nepůsobí cytotoxicky na lidské trombocyty, a to i přes vysoké zkoumané koncentrace. Předběžně lze tedy hodnotit, že je možné dále studovat mnohé účinky tohoto mořského alkaloidu.

Významnou aktivitu poskytl faspaplysin při inhibici agregace trombocytů v PRP. Míra inhibice může být závislá na užitém typu agregačního činidla, což lze pozorovat u zde zkoumané AK a kolagenu. U obou činidel byla inhibována aktivita destiček v závislosti na koncentraci. Faspaplysin účinněji inhiboval agregaci indukovanou kolagenem, kde bylo dosaženo maximální inhibice agregace při koncentraci faspaplysinu 25 μM , ale protideštičkové aktivita byla pozorována už při nižší koncentraci. Agregační činidla se liší mechanismem účinku na trombocytech a tím lze vysvětlit odlišnou schopnost faspaplysinu je inhibovat.

Vliv alkaloidu na koagulační kaskádu byl hodnocen pomocí koagulačních parametrů aPTT, PT a TT. Tím se zhodnotil vliv na vnitřní i vnější cestu aktivace koagulačního systému a zároveň na společnou část koagulační kaskády. U žádného testu nebyl pozorovaný významný vliv na inhibici v porovnání s čistou plazmou. Nicméně u dále zkoumaného vlivu faspaplysinu na trombin a FXa koagulační kaskády s použitím chromogenních substrátů lze pozorovat inhibici u obou zkoumaných faktorů. Jedná se ovšem o *in vitro* hodnocení, které nemusí odpovídat fyziologickým podmínkám.

Dosavadní znalosti poukazují na možnost dalšího zkoumání faspaplysinu jako antitrombotické látky, především v oblasti antiagregačního působení. Avšak antikoagulační aktivita se za testovaných podmínek zdá nevýznamná. Další metody by měly podrobněji prozkoumat antiagregační vlastnosti, možností je impedanční metoda, která hodnotí agregaci destiček v plné krvi.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ampofo, E.; Später, T.; Müller, I.; Eichler, H.; Menger, M. D.; Laschke, M. W. *The Marine-Derived Kinase Inhibitor Fascaplysin Exerts Anti-Thrombotic Activity*. Online. *Marine drugs*. Roč. 13 (2015), č.11. s. 6774–6791. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md13116774>. [citováno 4.5.2024].
- Bäckryd E. *Do the potential benefits outweigh the risks? An update on the use of ziconotide in clinical practice*. Online. *European journal of pain*. Roč. 22 (2018), č. 7, s. 1193–1202. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ejp.1229>. [citováno 3.5.2024].
- Bendas, G.; Schlesinger, M. *The GPIIb-IX complex on platelets: insight into its novel physiological functions affecting immune surveillance, hepatic thrombopoietin generation, platelet clearance and its relevance for cancer development and metastasis*. Online. *Experimental Hematology & Oncology*. (2022), č. 11, s. 19. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40164-022-00273-2>. [citováno 15.4.2024].
- Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction*. *Biotechnology Annual Review*. Roč. 11 (2005), s. 127–152. ISSN 1387-2656.
- Diapharma [Brochure]. *Chromogenix substrates*. [citováno 21.4.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/cs/chromogenix-s-2222/>.
- Diapharma [Package insert]. *Dapttin TC 3015981-016*. 2016a. [citováno 26.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/rea/dapttin-tc-6x10ml/>.
- Diapharma [Package insert]. *Technoplastin HIS 3013940RUO-018*. 2016b. [citováno 27.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/enz/technoplastin-his-12x2ml/>.
- Diapharma [Package insert]. *Technoclone Thrombin Reagent 3013950RUO-013*. 2016c. [citováno 27.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/enz/technoclone-thrombin-reagent/>.
- Diapharma [Package insert]. *Chromogenix S-2238 301929*. 2016d. [citováno 30.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/cs/chromogenix-s-2238/>.

- Diapharma [Package insert]. Chromogenix S-2222 301925. 2016e. [citováno 30.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/cs/chromogenix-s-2222/>.
- Diapharma [Package insert]. Multiplate ASPI test. 2018. [citováno 20.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/instruments/platelet-analyzers/multiplate/multiplate-aspitest/>.
- Diapharma [Package insert]. Technoclone Coagulation Control Normal 3015245RUO. 2022a. [citováno 26.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/cal-con/coagulation-control-normal-5x1ml/>.
- Diapharma [Package insert]. Technoclone Calcium Chlorid 25 mmol/l 3015028RUO_V06. 2022b. [citováno 26.3.2024]. Dostupné z: <https://diapharma.com/product/hemostasis/hemo/rea/calcium-chloride-25mmol-solution-100ml/>.
- Dulíček, P. *Poruchy hemostázy v klinické praxi*. Grada, 2022. ISBN: 978-80-271-3337-6. [citováno 27.4.2024].
- Dwivedi, R.; Pomin, V. H. *Marine Antithrombotics*. Online. *Marine drugs*. Roč. 18 (2020), č. 10, s. 514. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md18100514>. [citováno 3.5.2024].
- Estevez, B.; Du, X. *New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling*. Online. *Physiology* (Bethesda, Md.). Roč. 32 (2017), č. 2, s. 162-177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2016>. [citováno 10.4.2024].
- Galluzzi, L.; Aaronson, S. A.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Andrews, D. W.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*. Roč. 16 (2009), č. 8, s. 1093–1107.
- Goel, S.; Bergholz, J.S.; Zhao, J.J. *Targeting CDK4 and CDK6 in cancer*. Online. *Nat Rev Cancer*. Roč. 22 (2022), č. 6, s. 356-372. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00456-3>. [citováno 9.4.2024].
- Golebiewska, E.M.; Poole, A.W. *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Online. *Blood Rev*. Roč. 29 (2015). č. 3, s. 153-162. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003>. [citováno 21.4.2024].
- Grover, S. P.; Mackman, N. *Anticoagulant SERPINs: Endogenous Regulators of Hemostasis and Thrombosis*. Online. *Frontiers in cardiovascular medicine*. Roč. 9

(2022). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.878199>.

[citováno 8.5.2024].

- Hörmann, A.; Chaudhuri, B.; Fretz, H. DNA binding properties of the marine sponge pigment fascaplysin. Online. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Roč. 9 (2001), č. 4, s. 917-921. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00313-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00313-8). [citováno 4.5.2024].
- HYPHEN BioMed [Instruction for use]. Collagen D750-23/AG/005K/v4. 2018. [citováno 21.3.2024]. Dostupné z: <https://www.hyphen-biomed.com/products/primary-hemostasis>.
- Chottová Dvořáková, M.; Mistrová, E. *Fyziologie krve a základy imunity*. Karolinum. 2023. ISBN: 978-80-246-3833-1. [citováno 20.4.2024].
- Kujovich, J. L. *Factor V Leiden thrombophilia*. Online. *Genet med*. Roč. 13 (2011), č. 1, s. 1-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181faa0f2>. [citováno 5.5.2024].
- Loof, T. G.; Deicke, Ch.; Medinová, E. The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Roč. 4 (2014), č. 128. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00128>. [citováno 8.5.2024].
- Marcucci, R.; Grifoni, E.; Giusti, B. *On-treatment platelet reactivity: State of the art and perspectives*. Online. *Vascular Pharmacology*. Roč. 77 (2016), s. 8-18. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.10.005>. [citováno 19.4.2024].
- MedChemExpress [Data sheet]. Fascaplysin. [citováno 8.4.2024]. Dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/fascaplysin.html>.
- MedChemExpress [Handling instructions]. Fascaplysin. [citováno 6.3.2024]. Dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/fascaplysin.html>.
- Mittapalli, R.R.; Kumari, H. Recent Advances in the Synthesis of the Marine-Derived Alkaloid Fascaplysin and Its Metabolites Homofascaplysin A–C. *Molecules*. Roč. 29 (2024), č. 7, s. 1590. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules29071590>. [citováno 8.4.2024].
- Muttia, A.; Puteri, M. U.; Saputri, F.; Sauriasari, R.; Widyantoro, B. *Platelet Glycoprotein-Ib (GPIb) May Serve as a Bridge between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) and Atherosclerosis, Making It a Potential Target for Antiplatelet Agents in*

- T2DM Patients*. Online. *Life*. (2023), č. 13, s. 1473. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life13071473>. [citováno 10.4.2024].
- Neubauer, K.; Zieger, B. *Endotelial cells and Coagulation*. Online. *Cell and tissue Research*. Roč. 387 (2022), č. 3, s. 391–398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>. [citováno 25.4.2024].
 - Offermanns, S. Activation of Platelet Function Through G Protein- Coupled Receptors. *Circulation Research*. Roč. 99 (2006), č. 12, s. 1293- 1304.
 - Penka, M.; Penka, I.; Gumulec, J. a kol. *Krvácení*. Grada. 2014. ISBN: 978-80-247-0689-4. [citováno 13.4.2024].
 - Raehal, K. M.; Bohn, L. M. β -arrestins: regulatory role and therapeutic potential in opioid and cannabinoid receptor-mediated analgesia. *Handbook of experimental pharmacology*. Roč. 219 (2014), s. 427–443. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_22. [citováno 11.4.2024]
 - Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; et al. *Assay Guidance Manual*. Online. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. [citováno 4.3.2024].
 - Rokyta, R. *Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi*. Grada. 2015. ISBN: 978-80-247-4867-2. [citováno 18.5.2024].
 - Rozman, P.; Semenič. D.; Smrke, D. The Role of Platelet Gel In Regenerative Medicine. *Advances in regenerative medicine*. (2011), s. 319-349. [citováno 18.4.2024]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/23662>.
 - Rozsypal, H. *Základy infekčního lékařství*. Karolinum. 2015. ISBN: 978-80-246-2932-2. [citováno 11.4.2024].
 - Rucker, D.; Dhamoon, A. S. Physiology, Thromboxane A2. Online. StatPearls Publishing. 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/>. [citováno 21.4.2024].
 - Švihovec, J. a kol. *Farmakologie*. Grada. 2018. ISBN: 978-80-247-5558-8. [citováno 28.4.2024].
 - Tian, Z.; Lu, X. T.; Jiang, X.; Tian, J. *Bryostatín-1: a promising compound for neurological disorders*. Online. *Frontiers in pharmacology*. Roč. 14 (2023). Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1187411>. [citováno 3.5.2024].

- Turpie, A. G. G.; Esmon, Ch. *Venous and arterial thrombosis - Pathogenesis and the rationale for anticoagulation*. Online. *Thrombosis and haemostasis*. Roč. 105 (2011), s. 586-96. Dostupné z: <https://doi.org/10.1160/TH10-10-0683>. [citováno 24.4.2024].
- Walberg, J. White blood cell counting techniques in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. Roč. 10 (2001), č. 2, s. 72-76. ISSN: 1055-937X. [citováno 9.3.2024].
- Wang, C.; Wang, S.; Li, H.; Hou, Y.; Cao, H.; et al. *Marine-Derived Lead Fascaplysin: Pharmacological Activity, Total Synthesis, and Structural Modification*. Online. *Mar Drugs*. Roč. 21 (2023), č. 4, s. 226. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md21040226>. [citováno 10.4.2024].
- Wu, L.; Ye, K.; Jiang, S.; Zhou, G. *Marine Power on Cancer: Drugs, Lead Compounds, and Mechanisms*. Online. *Marine drugs*. Roč. 19 (2021), č. 9, s. 488. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md19090488>. [citováno 3.5.2024].