

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM VZNIKU AGREGÁTŮ KREVNÍCH DESTIČEK
S MONOCYTY *IN VITRO***

Diplomová práce

Hradec Králové 2024

Nikol Hubová

„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.“

Hradec Králové 2024

Nikol Hubová

Poděkování

Největší poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Alexandru Carazovi, PhD. za vedení, pomoc, cenné rady a taky za trpělivost, jak při práci v laboratoři, tak i u vypracování diplomové práce, zejména pak při vyhodnocování výsledků experimentů.

Dále děkuji také Jakovi Fadraersadovi, MSc. za pomoc v laboratoři, a hlavně při práci s průtokovým cytometrem. V neposlední řadě bych chtěla moc poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Nikol Hubová

Školitel: PharmDr. Alejandro Carazo Fernández, Ph.D.

Konzultant: Jaka Fadraersada, MSc.

Název diplomové práce: Studium vzniku agregátů krevních destiček s monocyty *in vitro*

Krevní destičky neboli trombocyty jsou bezjaderné buňky tvaru bikonkávních disků vznikající v kostní dřeni. Sehrávají důležitou úlohu v procesu primární zástavy krvácení. Tvorbou trombu zajišťují hemostázu a brání krevním ztrátám při porušení cévní stěny.

K agregaci destiček s monocyty, tzv. PMA (Platelet-monocytes aggregates), může dojít několika způsoby, ale krevní destičky musí být aktivované. PMA slouží jako nástroj k odhalení kardiovaskulárních poruch a bývá zvýšená při zánětech, u autoimunitních onemocnění a trombotických stavů.

Tato diplomová práce je zaměřena na studium vzniku agregátů krevních destiček *in vitro*. Studovali jsme přítomnost těchto agregátů z krve 14 pacientů rozdělených rovnoměrně mezi muže (7) a ženy (7), ve věku od 22 do 42 let. Pacienty jsme dále rozdělili podle pohlaví, věku a BMI.

Vzorky krve pacientů byly smíchány s kyselinou arachidonovou (AA) v různých koncentracích (1, 10, 50, 100, 125, 250, 500 μ M) a výsledky byly analyzovány pomocí průtokového cytometru. Jelikož je známo, že AA je aktivátorem krevních destiček, byl pozorován výskyt PMA v závislosti na dávce.

4-metylkatechol (4-MC) je přirozeně se vyskytující katechol s protideštičkovou aktivitou. Ve druhé části práce jsme zkoumali, zda tato sloučenina ovlivňuje tvorbu PMA.

Naše výsledky ukazují, že tvorba PMA je ovlivněna nejen aktivačními látkami (např. AA), ale také vnějšími faktory, tj. pohlavím, věkem a BMI. Ženy jsou k tvorbě agregátů trombocytů rezistentnější, proto u nich byly naměřeny nižší hodnoty PMA než u mužů. Vyšší hodnoty PMA byly naměřeny u pacientů s vyšší hodnotou BMI, což může být způsobeno tím, že nadváha je jedním z rizikových faktorů pro vznik zánětu a trombózy v organismu.

Ve vzorcích smíchaných s 4-metylkatecholem před smícháním s AA byl počet PMA nižší. Tyto výsledky podporují dříve popsany protidestickový účinek a představují 4-MC jako zajímavou sloučeninu pro budoucí výzkum.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Nikol Hubová

Supervisor: PharmDr. Alejandro Carazo Fernández, Ph.D.

Consultant: Jaka Fadraersada, MSc.

Title of diploma thesis: Study of platelet-monocyte aggregates induction *in vitro*

Platelets, or thrombocytes, are biconcave disk-shaped cells without a nucleus that originate in the bone marrow. They play an important role in the process of primary hemostasis. By forming a thrombus, they ensure hemostasis and prevent blood loss when the vessel wall is broken.

Aggregation of platelets with monocytes, so-called PMA (Platelet-monocytes aggregates), can occur in several ways, but platelets, have to be activated. PMA serves as a tool to detect cardiovascular disorders and is increased in inflammation, autoimmune diseases and thrombotic conditions.

This thesis is focused on the study of the formation of PMA *in vitro*. We studied the presence of these species in blood from 14 patients, divided equally between men (7) and women (7), aged between 22 and 42 years. We further divided the patients according to gender, age and BMI.

Patient blood samples were treated with arachidonic acid (AA) in different concentrations (1, 10, 50, 100, 125, 250, 500 μ M) and results were analysed by means of a flow cytometer. Since AA is known to be a platelet activator, a dose-dependent incidence of PMA was observed.

4-methylcatechol (4-MC) is a naturally-occurring catechol with antiplatelet activity. In the second part of the work, we examined whether this compounds affects the formation of PMA.

Our results show that the formation of PMA is influenced not only by activating agents (such as AA), but also by external factors, i.e. gender, age and BMI. Women are more rezistent to the formation of platelet aggregates, which is why lower PMA values were measured in them than in men. Higher PMA values were measured in patients with a higher BMI value, which may be due to the fact that excess weight is one of the risk factors for the development of inflammation and thrombosis in the body.

In samples treated with 4-methylcatechol prior to AA treatment, the number of PMA was lower. These results support the antiplatelet effect described previously and poses 4-MC as an interesting compound for future research.

Seznam zkratek

4-MC	4-methylcatechol
AA	Arachidonic acid (Kyselina arachidonová)
ADP	Adenosindifosfát
APC	Allophycocyanine
ASA	Acetylsalicylic acid (Acetylsalicylová kyselina)
ATP	Adenosintrifosfát
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMI	Body mass index
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
cGPM	Cyklický guanosinmonofosfát
CD	Cluster of differentiation (Diferenciační skupina)
DG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTS	Denzní tubulární systém
FC	Flow cytometry (průtoková cytometrie)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward scatter channel (Přední rozptyl)
GP	Glykoprotein
HLA	Human Leukocyte Antigen (Hlavní histokompatibilní antigen)
IL-1β	Interleukin-1 β
IP3	Inositoltrifosfát
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1 (Chemotaktický protein monocytů)
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor (Faktor stimulující

	kolonie makrofágů)
MFC	Multi-color flow cytometry
MK	Mastné kyseliny
NADH	Nikotinamidadeninukleotid
OKS	Otevřený kanálkový systém
PAF	Platelet-activating factor (destičky aktivující faktor)
PC	Fosfatidylcholin
PE	Fosfatidyletanolamin
PF4	Platelet factor 4 (Destičkový faktor 4)
PI	Fosfatidylinositol
PIP2	Fosfatidylinositol difosfát
PLA2	Fosfolipáza A2
PLC	Fosfolipáza C
PMA	Platelet-monocytes aggregates (Agregace destičky-monocyty)
PMT	Photomultiplier tube (Fotonásobící trubice)
PS	Fosfatidylserin
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid (Polynenasycená matná kyselina)
SLE	Systémový lupus erythematosus
SSC	Side scatter channel (Boční rozptyl)
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha (Tumor nekrotizující faktor alfa)
TXA₂	Tromboxan A ₂
vWF	von Willebrandův faktor

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1	Trombocyty.....	2
2.1.1	Morfologie trombocytů.....	2
2.1.2	Funkce trombocytů	4
2.1.3	Aktivace trombocytů.....	4
2.1.4	Metabolismus trombocytů	9
2.2	Leukocyty	9
2.2.1	Morfologie leukocytů.....	13
2.2.2	Dělení leukocytů	13
2.2.3	Funkce leukocytů	13
2.3	Monocyty.....	12
2.3.1	Morfologie monocytů	13
2.3.2	Dělení monocytů.....	13
2.3.3	Funkce monocytů.....	13
2.4	Agregáty destička-monocyty/ Platelets-monocytes aggregates (PMA)	14
2.5	Arachidonová kyselina (AA).....	15
2.6	4-methylkatechol (4-MC).....	16
2.6.1	Protideštičkový efekt 4-MC.....	17
2.7	Průtoková cytometrie.....	17
2.7.1	Funkce průtokového cytometru	18
2.7.2	Popis průtokového cytometru.....	18
2.7.3	Princip průtokové cytometrie	19
2.7.4	Prezentace výsledků	21
3	CÍL PRÁCE	23
4	METODICKÁ ČÁST	24

4.1. Odběr a příprava vzorku krve	24
4.2. Přidání fluorochromů.....	25
4.3. Přidání RBC, centrifugace a přidání PBS.....	26
4.4. Měření na průtokovém cytometru	28
4.4.1 Nastavení podmínek.....	29
4.4.2.Gating.....	30
4.5. Statistická analýza	30
5 VÝSLEDKY	32
5.1. Výsledky PMA za použití AA.....	33
5.2. Vliv 4-MC na vznik PMA	35
5.3. Výsledky PMA za použití AA + 4-MC.....	38
6 DISKUZE	41
7 ZÁVĚR	44
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

1 ÚVOD

Krevní destičky neboli trombocyty mají v organismu plno důležitých funkcí. Hrají klíčovou roli v procesu zástavy krvácení, a to tvorbou primární hemostatické zátky. Ovlivňují řadu dalších procesů, jako jsou zánětlivé stavy (např. ateroskleróza), a také infekční choroby typu malárie.

Monocyty jsou největší bílé krvinky. Jsou součástí nespecifické buněčné imunity a mají schopnost fagocytózy. Hrají důležitou roli v obraně organismu, opravě tkání i procesu homeostázy. Také se účastní metabolismu železa a destrukce starých erytrocytů.

Aby mohlo k agregaci mezi trombocyty a monocyty vůbec dojít, musí se trombocyty nějakým způsobem aktivovat. Možností aktivace je několik, jedním z nich je proces uvolňování cytokinů a chemokinů z granul, nebo taky pomocí P-selektinu. Agregace destiček s monocyty (PMA) je zvýšená u velké škály autoimunitních i zánětlivých onemocnění a ukázala se jako klíčový ukazatel odhalení nástupu těchto, ale hlavně kardiovaskulárních chorob.

Kyselina arachidonová (AA) je nenasycená mastná kyselina a důležitá součást buněčných membrán v organismu. Jakožto prekurzor syntézy eikosanoidů je známá jako aktivátor agregace trombocytů a monocytů, a to díky své schopnosti přeměnit se na tromboxan 2 pomocí enzymu cyklooxygenázy 1.

4-methylcatechol (4-MC) je polyfenolický substrát odvozený od kvercetinu. Přijímáme ho potravou, ale tělo si ho dokáže také samo vytvořit prostřednictvím lidského mikrobiomu. Jeho vliv na krevní destičky není zcela znám, ale nejčastěji je spojován s vápníkovými signálními drahami.

Tato diplomová práce je zaměřena na studium vzniku agregátů krevních destiček s monocyty *in vitro*. Vzorke krve 14 pacientů jsme v různých koncentracích smíchali s aktivátorem a inhibítorem agregace a na průtokovém cytometru vyhodnocovali výsledky. Pacienty jsme rozdělili podle pohlaví, věku a BMI. Ve druhé části jsme pak zjišťovali, zda samotný 4-MC má nějakou protideštičkovou aktivitu, a která jeho koncentrace se jeví jako nejlepší.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Trombocyty

Krevní destičky neboli trombocyty jsou malé bezjaderné buňky tvaru bikonkávního disku. Jejich průměr se pohybuje okolo 2-4 μM . Sahrávají nezbytnou roli v procesu primární zástavy krvácení. Jsou také nezbytnou složkou přirozených obranných mechanismů hostitele. Hemostázu (zástavu krvácení) zajišťují tím, že jejich agregací vzniká trombus (krevní sraženina). Tím také zabraňují ztrátám krve při porušení cévních stěn. Jejich další funkcí je produkce cytokinů, a tím iniciují a modulují imunitní odpověď.¹

Formují se v kostní dřeni z polyploidní kmenové buňky tzv. megakaryocytu procesem zvaným trombopoéza. Jsou druhou nejpočetnější skupinou tělísek v lidské krvi. Běžný počet trombocytů v 1 μl krve se pohybuje okolo 150–450 tisíc. Délka života, lépe řečeno, schopnost, kdy dokážou plnit své funkce, se pohybuje pouze mezi 7 až 10 dny. Přibližně dvě třetiny z celkového počtu trombocytů se nachází v krevní cirkulaci, zbytek je seskvestrován ve slezině. Zvýšený počet krevních destiček v krvi označujeme pojmem trombocytóza. Ta vede ke zvýšení srážlivosti krve. Naopak snížený počet krevních destiček v krvi označujeme jako trombocytopenie. Ta vede ke zvýšené krvácivosti a je zapříčiněna nízkým obsahem imunoglobulinu a vitamínu B₁₂. Trombocytopatií označujeme stav, při kterém funkce trombocytů selhává, a to z důvodu vnitřní poruchy.

2.1.1 Morfologie trombocytů

Při pozorování pod elektronovým mikroskopem rozlišujeme některé mikrostruktury, jako jsou granula či denzní tělíška, otevřený kanálkový systém (OKS), mikrotubuly, denzní tubulární systém, mitochondrie a další organely.¹

Strukturu trombocytu můžeme rozdělit do 4 oblastí podle funkce a to na: periferní zónu, zónu sol-gel, zónu organel a membránové systémy. (**Obr. 1**)

a) Periferní zóna

Je složená z destičkové membrány a submembránové oblasti. Zevní plášť neboli glykokalyx se skládá z glykoproteinů. Destičková membrána je složena z fosfolipidové dvojvrstvy. Fosfolipidy jsou důležitou složkou v procesu plazmatické koagulace. Uvnitř trombocytu se nachází fosfatidylserin (PS), fosfatidyletanolamin (PE, kefalin) a fosfatidylinositol (PI).

Na povrchu trombocytů najdeme sfingomyelin a fosfatidylcholin.¹

Hlavní složku membrány tvoří cholesterol. Cholesterol udržuje pružnost membrán a jejich permeabilitu (propustnost) pro jiné látky. Taky ovlivňuje transport látek přes membrány.¹

Submembránová oblast obsahuje aktinová vlákna. Pomocí těchto krátkých vláken je submembránová oblast spojena s plazmatickou membránou. Vlákna jsou poměrně krátká, pomáhají udržovat tvar destičky a taky se podílejí na změnách při aktivaci destiček.

Na membráně krevní destičky se nachází také velké množství antigenů jako jsou například antigeny HLA nebo specifické destičkové antigeny.¹

b) Zóna sol-gel (tzv. cytoskeleton)

Cytoskelet je tvořen zejména strukturami na bázi proteinů.

Podle morfologie a typu proteinů dělíme cytoskelet na:

- Mikrotubuly – základním stavebním prvkem je protein tubulin; podílejí se na transportu granulí a na vylučování (sekreci) jejich obsahu, udržují diskoidní tvar trombocytu
- Mikrofilamenta (tzv. aktinová filamenta – základ je tvořen aktinomyosinovým komplexem; mění tvar trombocytů)¹

c) Zóna organel

Zde probíhají metabolické procesy trombocytu.

Krevní destičky obsahují řadu granul, které se od sebe morfologicky liší: ¹

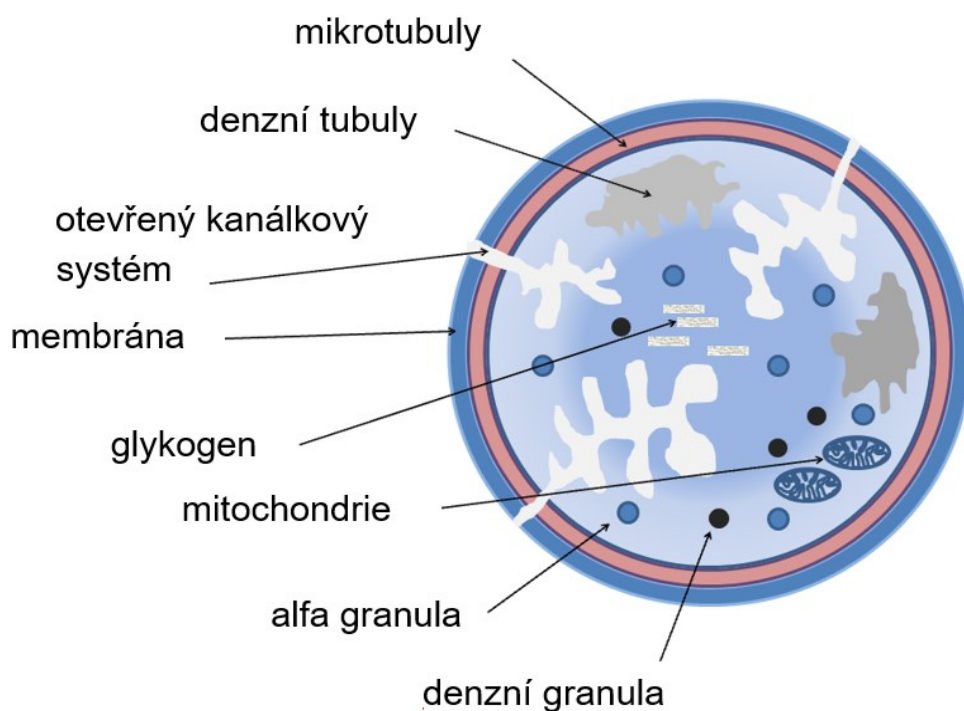
- alfa granula – obsahují řadu proteinů, jsou důležitou součástí interakce trombocytů s cévní stěnou; regulují rovnováhu mezi tvorbou a lýzou (rozpadem) koagula; jejich součástí je růstový faktor, který se podílí na hojení poraněné cévní stěny
- denzní granula – obsahují serotonin, ADP, ATP, Ca²⁺
- lysozomy – tvoří je hydrolytické enzymy
- peroxizomy – jejich součástí jsou enzymy katalázy reagující s peroxidem vodíku¹

d) Membránové systémy

Zde patří 2 hlavní části: otevřený kanálkový systém (OKS) a denzní tubulární systém (DTS).

OKS umožňuje obsahu alfa granulí dostat se na povrch buňky, usnadňuje látkovou přeměnu a zvětšuje povrch trombocytu, a to až několikanásobně. Taky vychytává tekuté látky a částice z okolí.

DTS tvoří síť úzkých kanálků a je zásobníkem vápenatých kationtů Ca²⁺. Je to místo syntézy prostaglandinů, TXA₂ a některých bílkovin.¹



Obr.1: Stavba krevní destičky

Upraveno podle:

https://www.wikiskripta.eu/w/Trombocyty#/media/Soubor:Platelet_structure.png

2.1.2 Funkce trombocytů

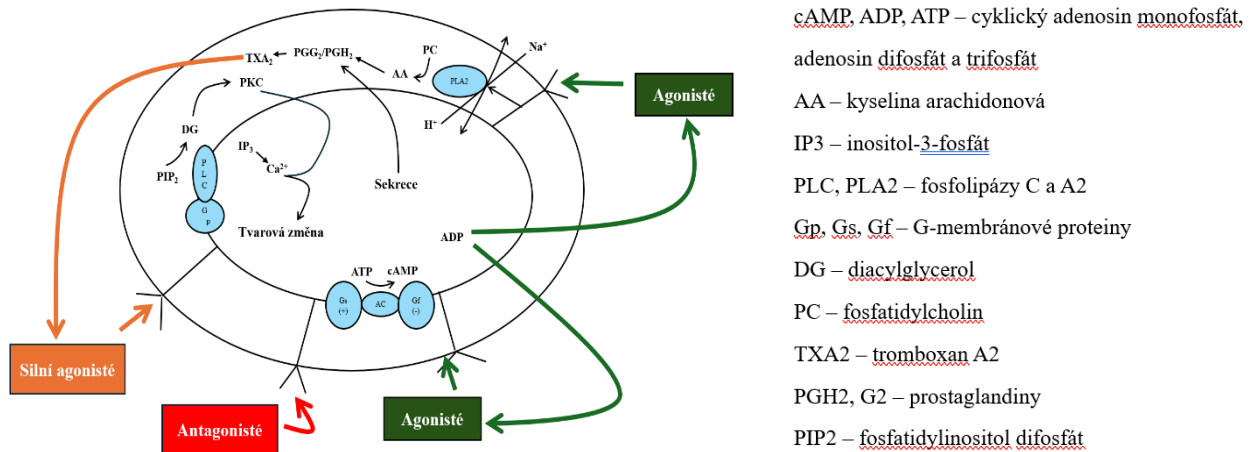
Trombocyty mají v organismu několik různých úloh. Uplatňují se při zástavě krvácení (hemostáze) tvorbou primární hemostatické zátky a aktivací koagulačních faktorů v plazmě. Mají vliv na správnou funkci endotelových buněk. Hrají důležitou roli při dlouhodobém a chronickém uzavírání nebo ucpání cévy krevní sraženinou (trombóza). Tento proces označujeme pojmem trombogeneze. Vykazují také fagocytární aktivitu.¹ Při systémovém zánětu secernují vazokonstrikční látky, které vedou k tonu (kontrakci) cév.

2.1.3 Aktivace trombocytů

Krevní destičky v organismu hodně interagují. Mezi nejvýznamnější interakce patří interakce s narušeným endotelovým povrchem nebo interakce s rozpustnými složkami krevní plazmy. Tyto interakce často vedou k aktivaci trombocytu. Při tomto procesu dochází ke změně tvaru destičky, změní se i metabolismus a látková přeměna trombocytu.²

Krevní destičky jsou v organismu aktivovány kontaktem se subendoteliálními strukturami (k tomu dochází například při poškození cévní stěny) nebo silnými aktivátory, jako jsou kolagen a trombin, po jejich vyplavení do krevního oběhu. Při aktivaci trombocytů se jedná o komplexní

proces, kterého se účastní celá řada podnětů, mezi které patří četné transdukce signálů, efektorové mechanismy, a to jak aktivace fosfolipázy C, metabolismus fosfoinositidů, mobilizace Ca^{2+} , tak i cyklus kyseliny arachidonové.² (**Obr. 2**)



Obr. 2: Aktivační cesty trombocytu

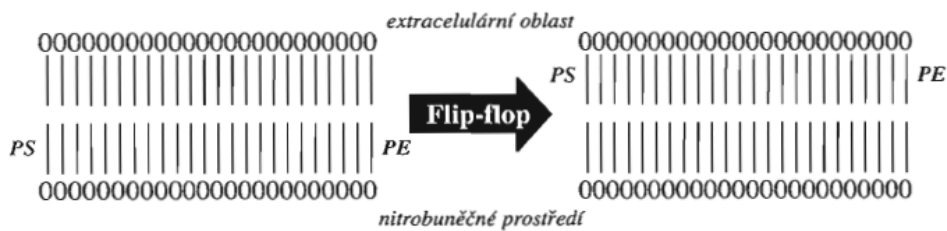
Při aktivaci destiček dochází k deformaci destiček, degranulaci, extruzi pseudopodií, uvolnění prokoagulačních faktorů a k sekreci dalších aktivátorů destiček.

Z destičkových granul se uvolňují ADP a TXA_2 .

Deformací destiček dochází ke zvětšení plochy, na které dochází k interakci faktorů koagulační kaskády. Podstatnou regulační roli zde hraje i fosfolipidová membrána na povrchu destiček. Důvodem je její negativní náboj, který významně urychluje interakci koagulačních faktorů.³

Při aktivaci trombocytů dochází uvnitř buňky k přesunům nitrobuněčného vápníku (uvnitř buňky je zvýšená koncentrace volných Ca^{2+} iontů) a také se mění membránové struktura trombocytu (tzv. fenomén flip-flop (**Obr. 3**) – dojde k přetočení dvojvrstvy fosfolipidů cytoplazmatické membrány).⁴

Mezi morfologické znaky aktivace destiček řadíme: změnu tvaru, adhezi, agregaci a retrakci. Při adhezi a agregaci může dojít k uvolňovací reakci, což vede k uvolnění obsahu granulí.⁴



Obr. 3: Fenomén flip-flop

<https://dokumenty.upce.cz/uk/ke-stazeni/pecka-lh-2.pdf>

Změna tvaru trombocytu

Tento děj probíhá velmi rychle. 15 sekund po podnětu dochází k depolymerizaci mikrotubulů, které udržují diskoidní tvar trombocytu, a zároveň dochází k polymeraci aktinu. Následně dochází k tvorbě pseudopodií (obvykle 5-6 výběžků) (**Obr. 4**). Je potřeba zajistit vydatný přísun energie ve formě ATP a přítomnost Ca^{2+} . Změny tvaru trombocytu můžeme laboratorně sledovat pomocí imunofluorescenčních metod nebo pod elektronovým mikroskopem.¹



Obr. 4: Shluk aktivovaných krevních destiček v plazmě (Kunkel, 2018); Zvětšení: 1600x

Adheze krevních destiček

Adheze (přilnavost) je proces, při kterém trombocyty přiléhají k jiným než destičkovým povrchům.⁵ Může se jednat třeba o přilnutí krevní destičky na subendotel poraněné cévy. Jedná se o komplexní proces, u kterého je nutná přítomnost mnoha adhezivních proteinů. Kromě trombocytů se adheze účastní i struktury endotelu, plazmatické adhezivní proteiny a hemodynamické změny – velikost a tvar cév, smykové rychlosti, viskozita a množství krve. Adhezivita je lineárně závislá na počtu trombocytů. Uplatňují se zde hlavně von Willebrandův faktor (vWF), fibrinonektin, fibrinogen a částečně i Ca^{2+} .^{1,2}

Von Willebrandův faktor obsahuje vazebná místa pro GP Ib, GP IIb/IIIa a pro kolageny typu I, III a IV. Tato vazebná místa jsou důležitá pro navázání faktoru na obnažená vlákna kolagenu a na připojení trombocytů vyvázáním vWF na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX.^{1,2}

Přímá adheze krevních destiček k vláknům kolagenu probíhá přes receptorový komplex GP Ia/IIa.²

Po kontaktu trombocytu se subendotelovými strukturami dochází ke změně tvaru destičky a díky vzniklým pseudopodiím přilne k povrchu. Může dojít až k desetinásobnému zvětšení povrchu. Adhezi destičky na kolagen zvyšuje přítomnost Mg^{2+} , a to až 5x.¹

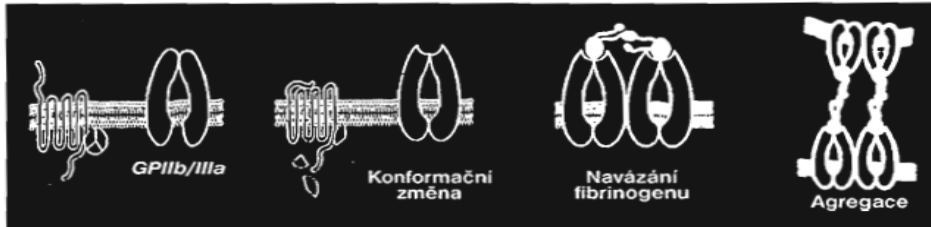
Agregace trombocytů

Agregace je proces, při kterém dochází ke vzájemnému shlukování krevních destiček. Je způsoben změnou konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa po obsazení receptorových míst na membráně krevní destičky agonisty. Tato konformační změna vede k vyvázání molekuly fibrinogenu nebo vWF mezi dvěma receptory GP IIb/IIIa na dvou různých destičkách.¹ (**Obr. 5**)

Nejdříve dochází ke spojování destiček hlavně přes receptory na jejich výbězcích (pseudopodiích). Tomuto ději říkáme primární agregace. Dochází při něm jenom k částečnému spojení destiček menším počtem glykoproteinových struktur GP IIb/IIIa. Tento proces má reverzibilní průběh a je nastartován ADP uvolněným z porušených tkání.^{1,2}

Při silnějším aktivačním impulsu k sobě destičky přiléhají těsněji a dochází k tzv. sekundární agregaci. Při tomto procesu dochází k obnažení většího počtu glykoproteinových receptorů, což má za následek vznik řady již nevratných dějů v trombocytu.¹

Jednotlivé agregované trombocyty se rozplývají a postupně navzájem splývají – dochází k jejich viskózní přeměně, tzv. metamorfóze. Agregace většinou následuje po adhezi, ale můžou jí vyvolat i induktory působící přímo na krevní destičky. Příkladem induktorů jsou například: ADP, TXA₂, kolagen, trombin, kyselina arachidonová, serotonin, PAF nebo vasopresin. ^{1,2}



Obr. 5: Průběh agregace

<https://dokumenty.upce.cz/uk/ke-stazeni/pecka-lh-2.pdf>

Uvolňovací reakce

V tomto ději se krevní destička centruje a mění svůj tvar z diskoidního na kulovitý. ¹

Dochází k sekreci alfa granulí z krevní destičky ven. Při silnějším podnětu dojde i k sekreci denzních granulí. Granule jsou přesunuty do centra trombocytu a jejich obsah je vylučován ven z destičky skrze kanálkový systém. ^{1,2}

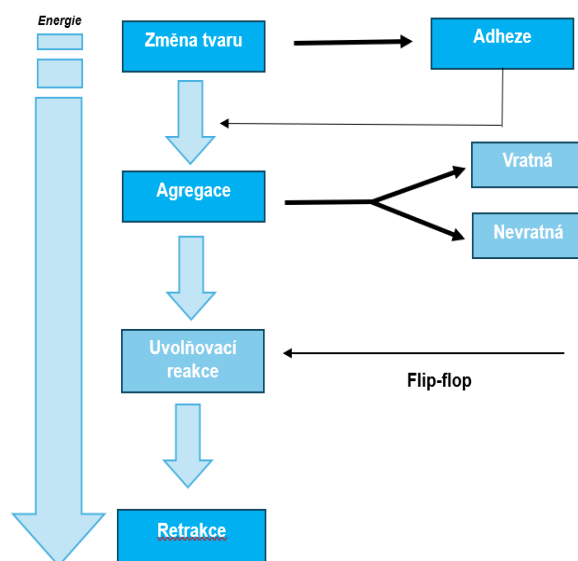
Současně se syntetizují a uvolňují i další aktivační látky, a to látky zesilující agregační efekt (ADP, TXA₂), vazokonstrikční látek (adrenalin, serotonin) a látky zasahující do procesu srážení krve (PF4). ¹

Retrakce krevní destičky

Po určitém čase dochází ke kontrakci (stažení) destičkového trombu, a to působením cytoskeletárního systému destičky. Tím dojde k obnovení průchodnosti poraněné cévy, která byla uzavřena primární hemostatickou zátkou. ¹

Retrakce jsou schopny pouze živé a funkční destičky, které přijímají velké množství energie ve formě ATP. Dochází k vytlačení séra ze smršťujícího se koagula. Tím, že se fibrinogen krevní destičky naváže na destičkový aktin, a to přes GP IIb/IIIa, dojde k podpoření retrakce koagula a ke kontrakci cévní stěny. ^{1,2}

Celé schéma aktivace shrnuto na **Obr. 6**



Obr. 6: Schéma aktivačních dějů v krevní destičce

2.1.4 Metabolismus trombocytů

Krevní destička nemá jádro. Nemůže tedy syntetizovat DNA a nedochází u ní k buněčnému dělení. I přesto může vykonávat velké množství buněčných funkcí. Potřebuje k tomu ale velké množství energie. Hlavním energetickým zdrojem přeměny je glykogen, kterého se v trombocytech nachází velké množství. Produkty glykolytického štěpení jsou v mitochondriích dále oxidovány a vzniká energie ve formě ATP.⁶

Pouze 1/3 ATP se účastní metabolismu trombocytu a je umístěna v tzv. metabolickém poolu. Ten je lokalizovaný v cytoplazmě, membráně a mitochondriích. Nemetabolický pool je lokalizován v denzních granulích. Není účastníkem metabolismu destiček a při sekreci bývá vypuzen do vnějšího prostředí.¹

2.2 Leukocyty

Bílé krvinky neboli leukocyty jsou specializované buňky imunitního systému. Jsou to bezbarvé buňky, většinou kulovitěho tvaru a jsou stálou součástí krve. Jedná se o buňky pohyblivé, schopné améboidního pohybu.

Počet bílých krvinek v těle dospělého člověka je v rozmezí od 4 do 9 x 10⁹/l krve. U novorozenců to může být dokonce až 30 x 10⁹/l. V kojeneckém věku už ale počet leukocytů klesá k hodnotě okolo 11x10⁹/l. Koncentraci leukocytů ovlivňuje řada faktorů, a to: pohlaví, věk, výživa, tělesná námaha, zdravotní stav a mnoho dalších. Počet bílých krvinek v organismu

stoupá po jídle nebo s probíhajícím infekčním onemocněním. Množství leukocytů v krvi se různě mění i během dne. Největšího množství leukocytů v krvi je dosaženo v průběhu spánku, naopak nejméně leukocytů se v krvi vyskytuje při aktivní fázi dne.⁷

Leukopenie je stav, kdy počet bílých krvinek v krvi klesne pod fyziologickou hodnotu.⁷

Leukocytóza je stav, kdy je množství bílých krvinek v krvi zvýšené, tedy nad fyziologickou hodnotou.⁷

2.2.1 Tvorba leukocytů

Proces, při kterém bílé krvinky vznikají, nazýváme leukopoéza. Tento dej je nezbytný k udržení stabilního počtu imunitních buněk v těle. Bílé krvinky vznikají společně s ostatními krevními elementy, a to konkrétně s červenými krvinkami a krevními destičkami. Všechny tři typy buněk vznikají v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky, kterou taky označujeme pojmem kmenová (progenitorová) buňka. Tato buňka má schopnost pluripotence, což znamená, že může diferencovat do mnoha buněčných typů. Díky této schopnosti se kmenové buňky dále mnohonásobně dělí a diferencují se na konkrétní krevní elementy.⁸

Dochází ke vzniku 2 hlavních typů krevních progenitorových buněk:⁸

- myeloidní progenitor – vyvíjí se z něj zejména granulocyty, makrofágy a dendrické buňky
- lymfoidní progenitor – z něj vznikají T-lymfocyty, B-lymfocyty i s podskupinami a NK buňky

2.2.2 Dělení leukocytů

Podle morfologie můžeme leukocyty rozdělit do dvou skupin na **granulocyty a agranulocyty**.
(Obr. 8)

Granulocyty vznikají v kostní dřeni a v cytoplazmě obsahují sekreční granula.⁹

Podle schopnosti zbarvení se dělí do tří skupin:

- **Neutrofilní granulocyty** – tvoří 50–70 % leukocytů. Jejich hlavní funkcí je fagocytóza a jsou významné v obraně proti bakteriálním infekcím. Zvýšený počet je projevem probíhající infekce.
- **Eozinofilní granulocyty** – tvoří asi 5 % bílých krvinek v krvi. Chrání organismus proti parazitům a plísním. Zvýšený počet v krvi je známkou parazitární infekce nebo alergické reakce.⁹

- **Bazofilní granulocyty** – tvoří asi 1 % leukocytů. Mají schopnost uvolňovat histamin a tím se podílejí na zánětlivé odpovědi organismu.¹⁰

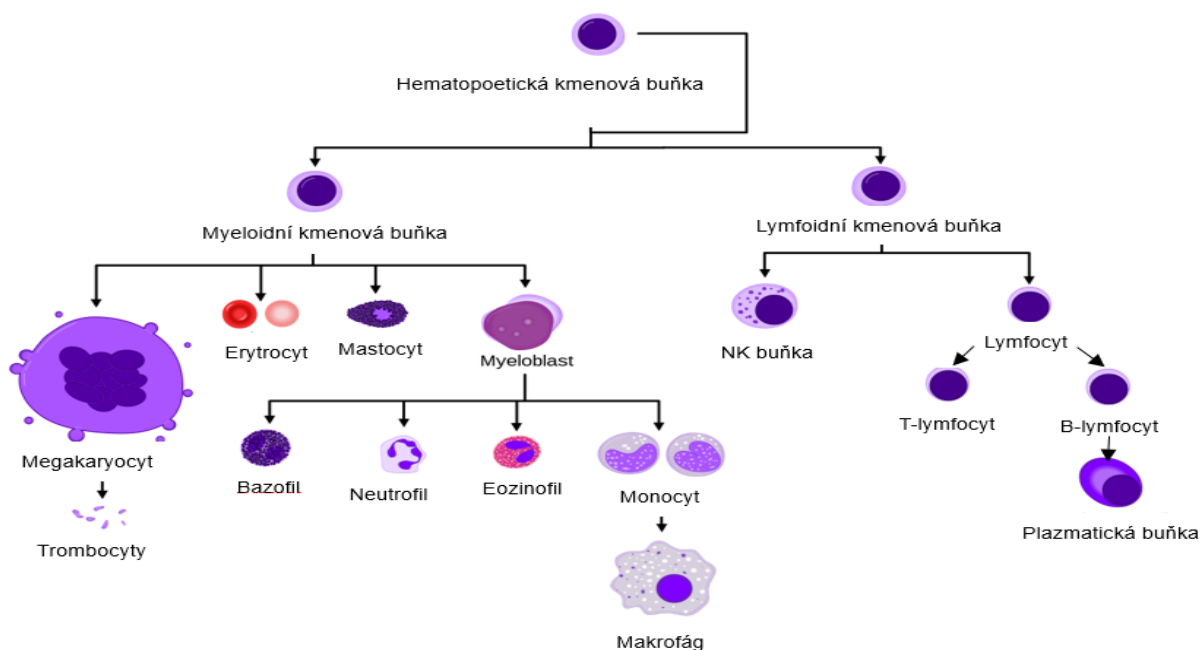
Agranulocyty jsou bez granulí a jsou tvořena v mízních tkáních.

Patří zde:

- **Monocyty** – představují asi 1 – 10 % leukocytů
- **Lymfocyty** – představují asi 20 – 40 % leukocytů

Lymfocyty se dále dělí na:

- **Lymfocyty typu T** – přímo likvidují cizorodé buňky
 - nedozrávají přímo v kostní dřeni, ale dostávají se do brzlíku, kde tzv. dospívají
- **Lymfocyty typu B** – mají schopnost hledat a rozpoznávat cizorodé molekuly (antigeny) a přeměnit se na jejich protilátky¹⁰
 - k jejich dospívání dochází přímo v kostní dřeni nebo v Peyerových plátech ve střevě¹¹



Obr. 8: Proces tvorby krve (hematopoéza)

Upraveno podle:

https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADl%C3%A1_krvinka#/media/Soubor:Hematopoesis_s_imple.svg

2.2.3 Funkce leukocytů

Funkcí bílých krvinek je zajišťovat obranyschopnost proti látkám, které nejsou našemu organismu vlastní.¹² Jejich hlavním úkolem je ničit viry, bakterie, plísňe, cizorodé částice, nádorově změněné buňky a ostatní mikroorganismy, které jsou pro organismus cizí.

2.3 Monocyty

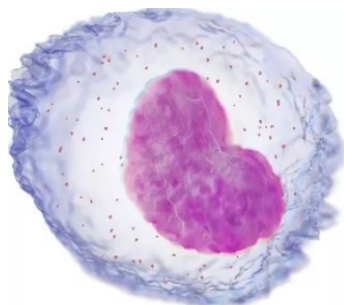
Monocyty (**Obr.7**) jsou velké buňky s oválným jádrem s 1-2 jadérky. Vznikají v kostní dřeni z myelo-monocytárních kmenových buněk, poté migrují do krve, tam několik dní cirkulují a teprve poté se dostávají do tkáně, a vyvíjí se v makrofágy.¹³ V organismu mají několik různých úloh. Hrají důležitou roli v homeostáze, v imunitní obraně nebo při opravě tkání.

Monocyty jsou největší bílé krvinky. Jejich průměr dosahuje až 20 μm . Průměrný počet monocytů v krvi dospělého člověka je $0,4 \times 10^9/1$ litr, což je přibližně 8 % z celkového množství bílých krvinek. Jejich životnost se pohybuje v rozmezí od 60 do 100 dnů. V krvi se vyskytují cca 3 dny a poté přecházejí do tkání, kde se diferencují.⁹

Monocyty jsou součástí nespecifické imunity, a to ve formě monocytomakrofágového systému. Ten, jak už je z názvu patrné, tvoří společně s makrofágy. Nacházejí se v krevním řečišti, vstupují do tkání, kde se mění na makrofágy. Podle místa výskytu máme pro makrofágy různá označení. V plicích jsou to alveolární makrofágy. V dutině břišní se vyskytují jako peritoneální makrofágy a v nervovém systému jako mikroglie. V kůži je známe jako Langerhansovy buňky.^{14,15}

Monocytopenie je pokles hladiny monocytů v krvi pod hodnotu $0,2 \times 10^9$.

Monocytóza je stav, kdy dochází ke zvýšení množství monocytů v krvi, a to nad hodnotu $0,8 \times 10^9$. Tento stav bývá průvodním jevem zánětlivého onemocnění.^{16,17}



Obr. 7: Monocyt

<https://www.sysmex.cz/academy/klinicke-informace/bile-krvinky/>

2.3.1 Morfologie monocytů

Cytoplazma monocytů neobsahuje žádná specifická granula, řadíme je tedy mezi agranulocyty. Vznikají z pluripotentních kmenových buněk, nejdříve přes monoblasty a později přes promonocyty. Jejich dozrávání řídí růstové faktory, stejně jako je tomu u ostatní krevních elementů. Hlavním růstovým faktorem monocytů je M-CSF (Macrophage colony stimulating factor).^{7,10,15,16}

2.3.2 Dělení monocytů

Monocyty mohou být nejlépe definovány pomocí monoklonálních protilátek v průtokové cytometrii. Prokázalo to usnesení na konferenci „Definice lidských krevních monocytů“, která se konala v Mnichově v říjnu roku 1999. Nejčastější a nejlepší volbou, jak monocyty jasně vymežit, je použít CD14 a CD16 protilátky. Povrchové markery CD14 jsou totiž pro monocyty typické.¹³

Cirkulující monocyty jsou klasifikovány do tří podskupin v závislosti na jejich expresi k povrchu markerů CD14 a CD16 na:¹⁸

- klasické (asi 85 % monocytů) – CD14⁺⁺CD16⁻ monocyty
- průměrné (5-10 % monocytů) – CD14⁺CD16⁺ monocyty
- neklasické (5-10 % monocytů) – CD14⁺CD16⁺⁺ monocyty

2.3.3 Funkce monocytů

Makrofágy se účastní metabolismu železa, procesu remodelace tkání a destrukce starých nebo poškozených erytrocytů (červených krvinek).

Monocyty jsou schopné se přeměnit (diferencovat) v dendritické buňky, které jsou propojovacím můstkem mezi specifickou a nespecifickou imunitou. Po fagocytóze na svém povrchu vystavují cílové antigeny pro T-lymfocyty, čímž dochází k jejich aktivaci. Aktivované monocyty produkují protizánětlivé cytokiny.

Cytokiny jsou aktivátory specifické imunity, a vedou k rozvoji celkové reakce organismu na přítomnost patogenu (působí protizánětlivě).^{14,15}

2.4. Agregáty destička-monocyty/ Platelets-monocytes aggregates (PMA)

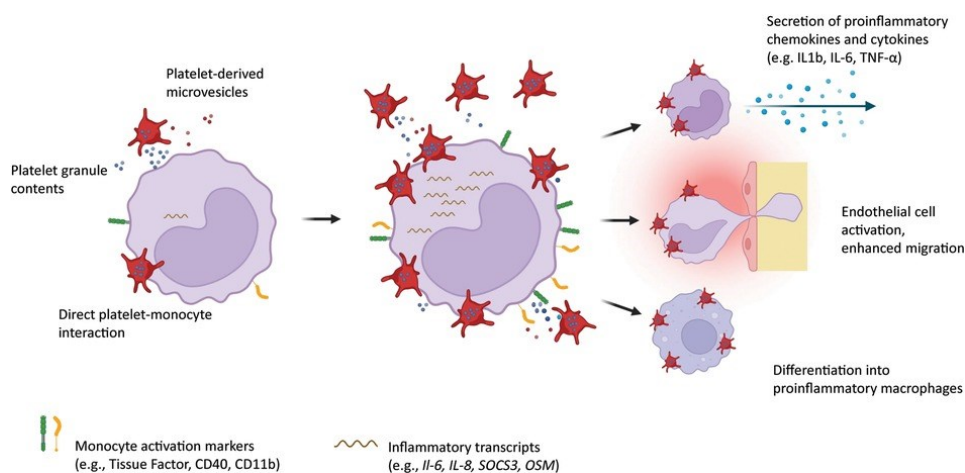
Krevní destičky jsou klíčové faktory primární hemostázy a trombózy. Také se ukázaly jako nezbytné buněčné mediátory vrozené imunity a zánětu.¹⁹ Interakce krevních destiček s monocyty se ukázala jako klíčový mechanismus spojující trombózu a zánět. Aby se podpořila prozánětlivá a prokoagulační efektorová funkce trombocytů, jsou agregáty monocyty a trombocytů (PMA) zvýšené a koreluje se závažností onemocnění.²⁰ Aby se destičky mohly vázat na monocyty, musí být aktivované.²¹

Aktivované destičky se vážou na cirkulující monocyty a vytvářejí agregáty destiček a monocyty (PMA). K této agregaci může dojít několika různými mechanismy. **(Obr. 9)** Jedním z nich je připojení trombocytů k monocyty prostřednictvím destičkového P-selektinu a monocytového PSGL1. Po aktivaci destiček se P-selektin uložený v alfa granulech přemísťuje na povrch destiček a váže se glykoproteinový ligand 1 (PSGL1), který je kontinuálně exprimován na povrchu monocyty. Toto počáteční spojení destiček s monocyty je ještě posíleno vazbou CD40L destičky k monocyty CD40 a vazbou destičkového GPVI na extracelulární matrix metaloproteázového induktoru (EMMPRIN, CD147).²²

Dalším mechanismem je uvolňování granul obsahujících chemokiny a cytokiny.¹⁹

Tyto interakce mají za následek zvýšení regulace prozánětlivých povrchových markerů monocyty (např. CD40), migraci (CD11b/CD18) a prokoagulačního tkáňového faktoru (TF), který je hlavním iniciátorem koagulace. Monocyty vystavené působení trombocytů navíc vylučují prozánětlivé cytokiny (TNF- α , MCP-1, IL-1 β). Monocyty se při kontaktu s krevními destičkami tedy stávají prozánětlivými a prokoagulačními, což jen zdůrazňuje, že je tato interakce ústředním prvkem trombotického zánětu.¹⁹

PMA se ukázalo jako klíčový biomarker k odhalení nástupu kardiovaskulárních onemocnění. Agregace destiček a monocyty je zvýšená napříč celým spektrem zánětlivých a autoimunitních onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární onemocnění, systémový lupus erythematosus (SLE) a COVID-19 a jsou pozitivně spojovány se závažností těchto nemocí. Všechny tyto systémové poruchy jsou charakterizovány zvýšeným rizikem trombotických komplikací.¹⁹



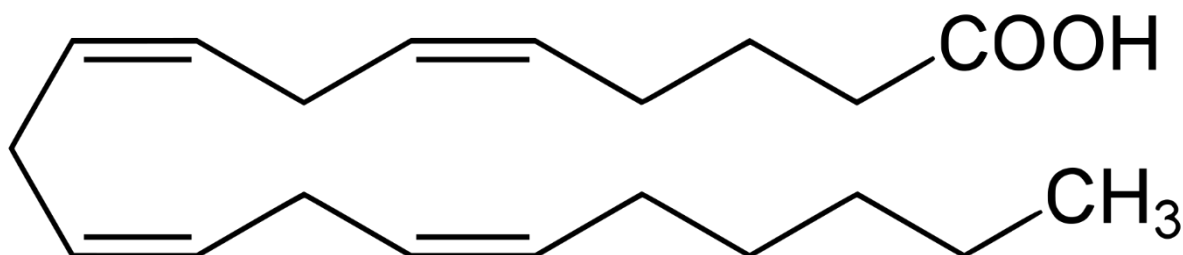
Obr. 9: Průběh vzniku PMA

https://www.researchgate.net/figure/Platelets-interact-with-circulating-monocytes-by-direct-attachment-onto-the-monocyte_fig1_371124918

2.5. Arachidonová kyselina (AA)

Arachidonová kyselina (AA) je nenasycená mastná kyselina (PUFA = Poly Unsaturated Fatty Acid) se čtyřmi dvojnými vazbami, je to tedy tzv. tetraenová kyselina. Sumární vzorec AA je $C_{20}H_{32}O_2$ (**Obr. 10**) a systematický název kyselina all-*cis*-5,8,11,14-eikosatetraenová. AA je důležitou složkou membránových fosfolipidů, ale také se ve velkém množství vykytuje v tukové tkáni živočichů.

Přímým zdrojem kyseliny arachidonové v potravě je maso a živočišné tuky. Jelikož není považovaná za esenciální MK, v našem těle je za její prekurzor označována kyselina linolová, která patří mezi esenciální (tělu vlastní) MK.²³ Linolová kyselina je nejprve oxidována za pomoci NADH mezi uhlíky C6 a C7. Tím vzniká kyselina gama-linolenová. Posléze dochází díky elongázovému systému k přidání dvou uhlíků. Posledním krokem je vznik nenasycené vazby mezi uhlíky C5 a C6 a to za spotřeby NADH.²⁴



Obr. 10: Struktura kyseliny arachidonové

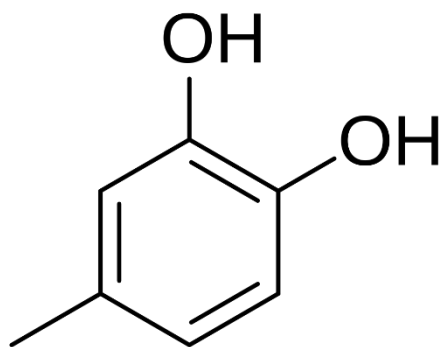
AA je prekurzorem syntézy eikosanoidů. To jsou endogenní látky velmi silně působící na organismus, zahrnující například leukotrieny, prostaglandiny, prostacykliny, thromboxany nebo důležité signalizační látky a hormony. Aby k tomu mohlo dojít, tak se AA uvolňuje z uhlíku C2 glycerolového skeletu fosfolipidů. Tato hydrolýza je katalyzována fosfolipázou A2. Poté můžeme arachidonát využít v dalších metabolických drahách.²⁴

Prostanoidy jsou syntetizovány cyklooxygenázovou cestou, leukotrieny a lipoxiny cestou lipoxygenázovou.²⁴

Společně s kolagenem nebo ADP patří k aktivátorům agregace. Sama o sobě trombocyty neaktivuje. Pomocí enzymu cyklooxygenázy 1 (COX-1) se ale mění na tromboxan A2, a ten je silné proagregační činidlo.¹⁹

2.6. 4-methylkatechol (4-MC)

4-methylkatechol (4-MC) (také známý jako 4-methylbenzen-1,2-diol) (**Obr. 11**) je polyfenolický substrát, který vzniká při metabolismu přírodní sloučeniny, například kvercetinu. Kvercetin je rostlinný flavonol obsažený v různých druzích ovoce, včetně jablek, meruněk, avokáda nebo broskví.²⁵ Polyfenoly přijaté stravou mají ale obecně nižší biodostupnost a dosahují nízké plazmatické koncentrace. Proto menší fenolické sloučeniny a metabolity, jako je právě 4-MC, mohou vznikat v lidském těle, přesněji v lidském mikrobiomu. Ty jsou totiž pro lidské tělo mnohem lépe absorbovatelné než molekuly velké. Také bylo prokázáno, že strava bohatá na polyfenoly má příznivý efekt na kardiovaskulární zdraví.²⁶



Obr. 11: *Struktura 4-methylkatecholu*

Studie na zvířatech prokázaly efekt 4-MC na mnoha modelech. 4-MC jednoznačně zmírnil neurotoxicitu, poškození ledvin a byly prokázány jeho protektivní účinky na β -buňkách. Také je pozitivně spojován s výrazným ochranným účinkem na nervovou tkáň, a to zejména u terapie deprese, neuropatické bolesti nebo při zotavování po poškození jak motorických, tak i

percepčních nervových tkání.²⁶ Působí také vasodilatačně, inhibuje enzymy tvořící reaktivní formy kyslíku nebo interaguje se stopovými kovy v lidském těle.

Na chronickou bolest je jeho mechanismem účinku zvyšování hladin BDNF faktoru.

2.6.1. Protideštičkový efekt 4-MC

Protideštičkový efekt 4-MC není zcela znám. Ví se ale, že je založen na interakci s vápníkovou signální dráhou. Ve studiích bylo zjištěno, 4-MC nemá významný vliv na cyklooxygenázu 1. I když byl prokázán vliv na tromboxansyntázu, nebyla tato inhibice považována za klinicky významnou, protože ji bylo dosaženo při relativně vysoké koncentraci 100 M.²⁶

K výraznému poklesu agregace krevních destiček došlo při kombinaci 4-MC s ASA, a to i při velmi nízkých koncentracích těchto látek. Je to vysvětleno tím, že ASA inhibuje COX-1, což je jediná forma COX, která se v krevních destičkách vyskytuje.

Dále byl sledován účinek 4-MC na PAF, což je důležitý posel pro mnoho buněčných populací. Na krevní destičky působí prostřednictvím receptoru PAF-1, který je vázán na receptor Gq. Tyto receptory vedou ke zvýšení hladiny Ca^{2+} , ale taky k aktivaci proteinkinázy C prostřednictvím IP3 a uvolňováním DG. Výsledkem toho sledování je, že 4-MC inhibuje PAF indukovanou agregaci destiček. Rozsah této inhibice ale nebyl příliš výrazný a lze proto vyloučit interferenci na úrovni receptorů.²⁶

Ve studiích bylo potvrzeno, že je 4-MC účinnější než ASA přibližně o jeden řád, a to jak na agregaci destiček vyvolanou AA, tak i kolagenem.²⁶

2.7. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FC, anglicky flow cytometry) je technika pro kvalitativní a kvantitativní analýzu buněk nebo jiných částic (např. mikroorganismů) v suspenzi. Buňky rozlišuje buď na základě jejich fyzikálně – chemických vlastností, kam řadíme například velikost, množství granul nebo obsah DNA. Další možností rozlišení buněk je rozlišení pomocí rozptylu světla a fluorescence. Jako zdroj světla využívá nejčastěji lasery, ale i obloukovou lampu nebo LED lampu.²⁷

Jedná se o molekulárně biologickou metodu, pomocí které můžeme identifikovat a kvantifikovat různé znaky v buňce a měřit fyzikální, chemické a biologické vlastnosti jednotlivé buňky rychlostí až 10 000 buněk za vteřinu.²⁸

Pro tuto metodu je nutné, aby se buňky nacházely v suspenzi. K tomu používáme tzv. nosnou kapalinu (většinou se používá voda nebo fosfátový pufrovaný roztok – PBS). V případě celých tkání je potřeba tkáň nejprve rozrušit a uvolnit z ní jednotlivé buňky do suspenze s nosnou kapalinou.

2.7.1 Funkce průtokového cytometru

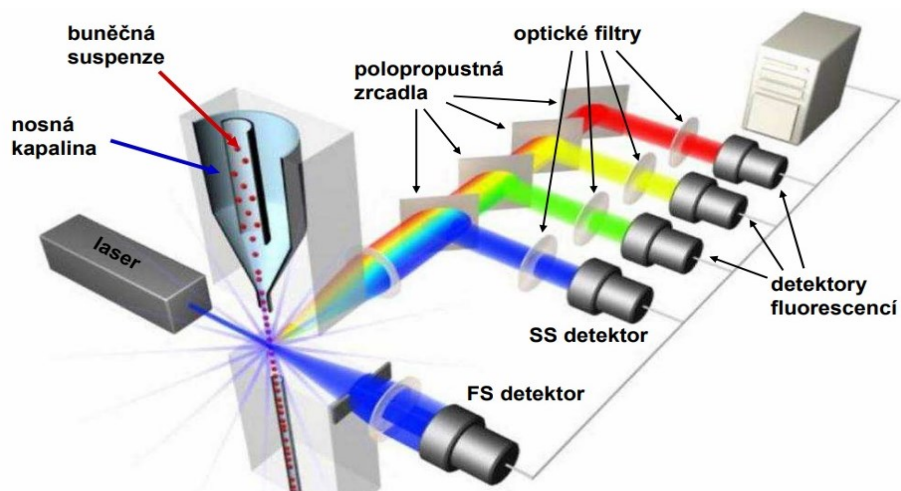
Imunodiagnostika hematologických chorob pomocí průtokové cytometrie se stává s nárůstem znalostí o fenotypu krevních buněk stále důležitější a běžnější součástí klinické praxe. Vyšetření biologického vzorku (nejčastěji periferní krve, kostní dřeně, lymfatické uzliny, výpotku či mozkomíšního moku) pomocí průtokového cytometru slouží k imunologické a diferenciální diagnostice a prognostické stratifikaci (rozdělení) hematologických malignit (leukémie, lymfomy).²⁹ Průtoková cytometrie dále pomáhá k určení rozsahu postižení, taky díky ní můžeme sledovat průběh léčby, detekovat minimální residuální nemoc a včas zachytit relaps choroby. Nezastupitelnou roli hraje i u transplantací krvetvorných buněk.

Indikací k vyšetření na FC jsou kvantitativní poruchy v krevním obraze – leukocytóza, cytopenie (leukopenie, anémie, trombocytopenie, pancytopenie), eosinofilie, přítomnost atypických buněk v periferní krvi nebo v kostní dřeni. Další indikací je pak klinické podezření na hematologickou chorobu jako je hepatomegalie nebo splenomegalie, trombocytóza s přítomností abnormálních trombocytů nebo defekty ve funkci trombocytů atd.²⁹

Tyto indikace k vyšetření na FC byly stanoveny skupinou mezinárodních expertů v roce 2006 na konferenci v Bethesdě (Bethesda International Consensus Conference on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia).^{29,30} Skupina se také dohodla, že vyšetření na FC nebude obecně indikováno v následujících situacích: zralá neutrofilie, polyklonální hypergammaglobulinemie, polycytemie, trombocytóza a bazofilie.²⁹

2.7.2 Popis průtokového cytometru

Průtokový cytometr je složen ze 3 systémů. První systém je systém fluidní, kdy dochází k transportu vzorku v proudu nosné kapaliny k laserové paprsku. Druhým systémem je systém optický, ve kterém se nachází laser, zrcadla a optické filtry a zajišťuje tedy paprsek světla a detekci emisního spektra. A poslední částí je systém detekční – elektronika. Ten zajišťuje interpretaci a digitalizaci naměřených dat.^{31,32,33} **(Obr. 12)**

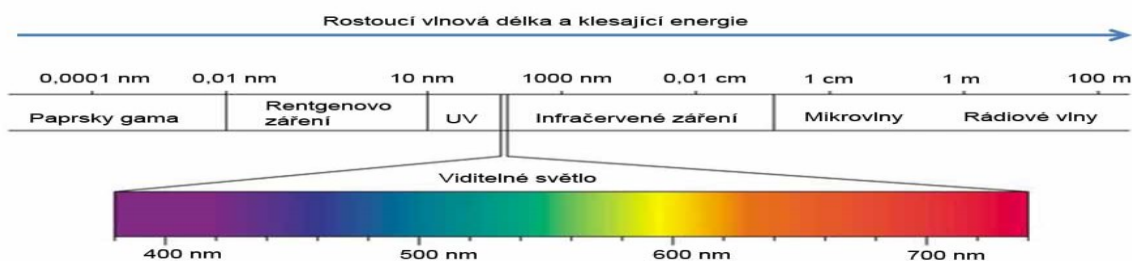


Obr. 12: Složení průtokového cytometru

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

2.7.3 Princip průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je založena na principu detekce fluorescenčního signálu. Buňky samotné ale samy od sebe fluoreskují jen málokdy. Proto pro sledování požadovaných znaků používáme protilátky značené fluorescenčně. Nejčastěji je v průtokovém cytometru zařazeno pět fluorescenčních kanálů, které proměřují současně 5 různých vlnových délek světla emitovaného z fluorochromu (barvivo, které se váže na nukleové kyseliny nebo jinou součást buňky v izotonickém roztoku). Mezi nejčastěji používané fluorochromy řadíme FITC (fluorescein isothiocyanate), jehož absorpční maximum je při vlnové délce 490 až 495 nm (**Obrázek č. 13**) a emituje světlo o vlnové délce 520 nm v zelené oblasti a APC (allophycocyanin) s absorpčním maximem při vlnových délkách 594 nm až 633 nm. APC emituje světlo ve vlnové délce 660 nm v červené oblasti. Přehled nejčastěji užívaných samostatných fluorochromů najdete v **tabulce č. 1**.



Obr. Elektromagnetické spektrum

Obr. 13: Elektromagnetické spektrum

<https://labguide.cz/reagencie/fluorochromy/>

Tabulka č. 1: *Samostatné fluorochromy najčastejši používané v prútokovej cytometrii*

Fluorochrom	Vlnová dĺžka excitačná	Vlnová dĺžka emisná	Fluorescenčná farba
	(nm)	(nm)	
FITC	488	520	zelená
APC	630	661	červená
PE	488	580	oranžová
PerCP	488	675	červená

Obarvené buňky s navázanými fluorochromy v izotonickom roztoku pak prešú úzkou tryskou do silnejšej kapiláry, ve ktorej prúdi nosná kapalina. Zařadí buňky do řady za sebou, a detekuje se každá buňka zvlášť. Tento jev se nazývá hydrodynamická fokusace. Světlo, které vzniklo interakcí buněk usměrněných hydrodynamickou fokusací je rozděleno podle vlnové délky emitované fluorescence. Na tomto rozdělení se podílí systém hranolů, optických filtrů a zrcadel.³⁴ Takto separované (rozdělené) světlo dopadá na jednotlivé detektory, a vytváří elektrické impulsy, které jsou zesíleny fotonásobičem (zesílení se provádí lineárně nebo logaritmicky).

Takto vzniklé a zpracované elektrické signály charakterizující každou jednotlivou buňku řadou parametrů bývají poměrně těžce amplifikovány, digitalizovány a počítačově zpracovávány. Digitálně můžeme najednou analyzovat všechny zjištěné parametry. Dokonce je můžeme i vzájemně kombinovat, a to díky elektronické selekce subpopulací, kterou označujeme jako gating.³¹ Gating se provádí na základě fyzikálních a fyzikálně chemických vlastností buněk.

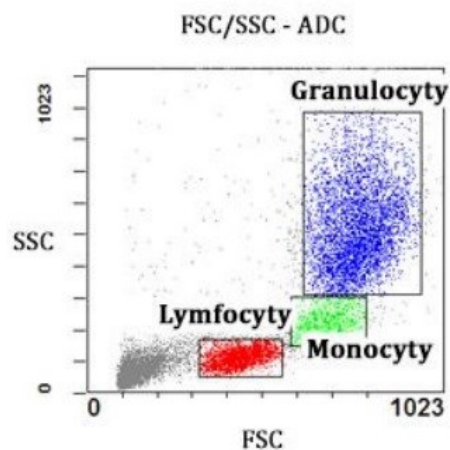
Mezi měřené parametry patří rozptyl světla. Máme 2 možnosti detekce rozptylu světla. První je FSC (Forward Scatter Channel) neboli dopřední rozptyl. Druhou možností je SSC (Side Scatter Channel) neboli boční rozptyl. Dopřední rozptyl má fotodiody, díky kterým detekuje signál v úhlu 20° od osy laserového paprsku. Získává informace o tvaru, velikosti a homogenitě částic. V 90° úhlu od osy laserové paprsku se nachází fotonásobící trubice (PMT – Photomultiplier tube). Ta zachycuje boční rozptyl a s ním informace o granularitě buněk. Tato informace je užitečná při rozlišování mezi lymfocyty a granulocyty.^{28,35}

Tento princip můžeme využít k typizaci jakékoliv buňky, např. leukemické buňky nebo buňky nakažené virem HIV. Na základě této charakterizace poté můžeme buňky třídit dle sledovaných znaků.

2.7.4 Prezentace výsledků

Výstupem analýzy měření na FC jsou výsledky v číselné i grafické podobě.

Základním prostředkem vizualizace dat získaných měřeními na průtokovém cytometru je **scatter diagram**. (Obr. 14) V tomto grafu se na ose x nachází data získaná FSC a na ose y data z SSC. Osi grafů se značí názvem fluorochromu a povrchovým markerem. Když je buňka pozitivní pro oba markery, tak budou buňky zobrazeny v pravém horním kvadrantu a v případě negativního výsledku pro oba markery budou v levém dolním kvadrantu.^{36,37}



Obr. 14: Bodový graf s informacemi o morfologii buněčné populace

<https://www.slideshare.net/slideshow/humoral-immunodeficiencies-67806540/67806540#20>

Ke grafickému zobrazení používáme také tzv. histogramy. Rozlišujeme histogramy jednoparametrové a dvouparametrové. (Obr. 15)

Jednoparametrové histogramy

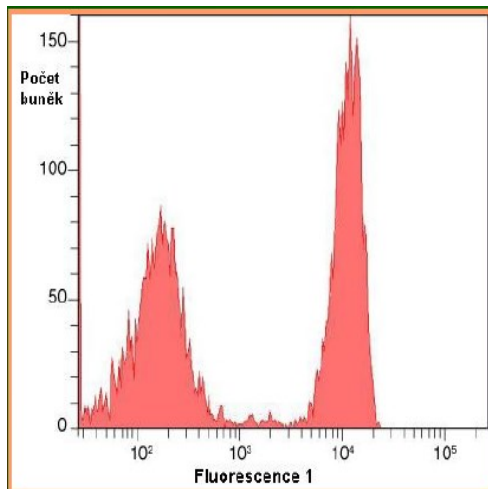
Na ose x je znázorněna intenzita signálu FSC, a SSC a na ose y četnost buněk.

Dvouparametrové histogramy

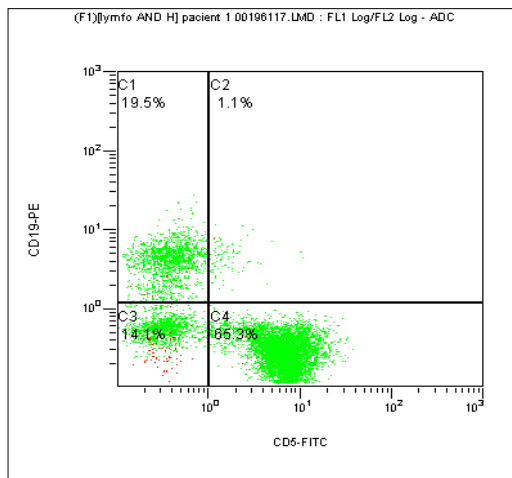
Osa x znázorňuje intenzitu jednoho měřeného parametru a osa y intenzitu druhého měřeného parametru.

Množství buněk v histogramu je vyobrazeno různými způsoby. Rozlišujeme několik typů histogramů. První z nich je tzv. dot-plot histogram, kde je množství buněk znázorněno hustotou bodů. Dalším typem je contour-plot histogram, kde je množství buněk znázorněno čarami podobnými vrstevnicím na mapách. A dalším typem je density-plot histogram, kde jsou buňky označeny barvami znázorňujícími hustotu. My jsme nejčastěji využívali histogram density plot.

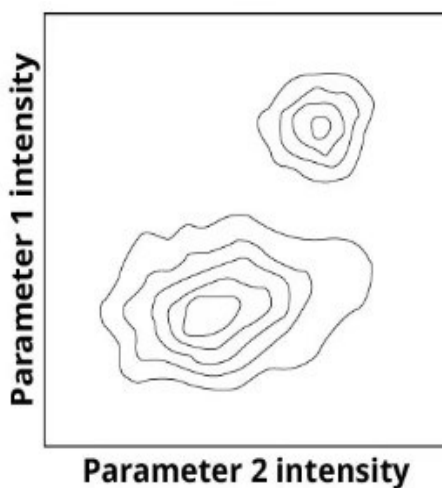
Údaje získané měřením uchováváme v elektronické podobě ve formě tzv. listmode, která umožňuje pozdější zpracování uložených dat, nové gatování.



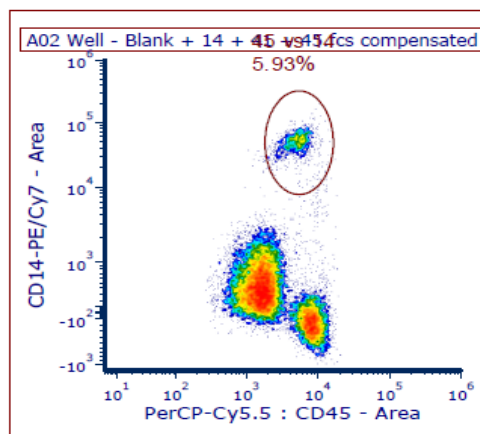
Histogram plot (jednparametrový h.)



Dot-plot histogram



Contour-plot histogram



Density-plot histogram

Obr. 15: Ukázky histogramů

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je studovat a zhodnotit vznik PMA agregátů *in vitro* pomocí průtokového cytometru na reálných krevních vzorcích po stimulaci s kyselinou arachidonovou jakožto aktivátorem krevních destiček.

Dalším cílem je také sledovat a studovat aktivitu 4-methylkatecholu (4-MC) na vznik PMA.

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Odběr a příprava vzorku krve

Vzorek krve, se kterou jsme experiment prováděli, musí být pacientům odebrána nejlíp ráno a na lačno. Vzorky nám byly na fakultu dováženy přímo z Fakultní nemocnice Hradec Králové, se kterou naše skupina spolupracuje. Vzorky by měly být zpracovány nejlépe do 4 hodin.

U každého vzorku krve je pro náš experiment důležité si poznačit, zda je to muž nebo žena, jak je starý a kolik váží. Podle toho se později jednotlivé vzorky po vyhodnocení v průtokovém cytometru rozdělí.

Experiment začíná tím, že se do každé zkumavky Eppendorf mikropipetou napipetuje 50 μL čisté krve.

Poté si postupně naředíme roztoky aktivátorů a inhibitorů agregace s čištěnou vodou v různých koncentracích. Ty se budou později přidávat ke krvi. Ředění roztoků se provádí pomocí jednoduché rovnice $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$, kdy c_1 je koncentrace vzorku arachidonové kyseliny (AA), tedy 3 mM, c_2 je koncentrace čisté krve pacienta, tedy 50 μL a V_2 je objem AA, která má být v jednotlivých roztocích dosažena. Hodnota V_1 nám po vypočítání udává, jaké množství 3 mM AA máme použít na přípravu roztoku o dané koncentraci. V rovnici měníme jen hodnoty V_2 , pro jednotlivé koncentrace AA ve vzorku (1, 10, 50, 100, 125, 250, 500 μM). Po zjištění množství AA odečteme množství od 50 μL čisté krve a víme, jaké hodnoty napipetovat.

Příklad výpočtu pro koncentraci 500 μM AA:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$3000 \times V_1 = 50 \times 500$$

$$V_1 = c_2 \times V_2 / c_1$$

$$V_1 = 50 \times 500 / 3000$$

$$V_1 = \mathbf{8,3 \mu\text{L AA}}$$

$$50 \mu\text{L} - 8,3 \mu\text{L} = \mathbf{41,7 \mu\text{L čisté krve}}$$

U 4-methylkatecholu (4-MC) se s ředěním postupovalo stejným způsobem, jen s tím rozdílem, že jsme museli 100 mM roztok 4-MC, který jsme měli v laboratoři k dispozici, pro jednotlivé koncentrace (1, 10, 20, 25, 50,75, 100 μ M) naředit s vodou. Pro koncentraci 100 μ M se smíchalo 10 μ L 100 mM roztoku 4-MC s 90 μ L vody. Vytvořili jsme tak naředěný 10 mM roztok. Z toho roztoku jsme odebrali 10 μ L a smíchali jej s 90 μ M vody za vzniku 1 mM roztoku. Ten jsme použili pro roztoky s koncentrací 75, 50, 25, 20 a 10 μ M 4-MC. Pro výslednou koncentraci 1 μ M 4-MC jsme použili 10 μ L naředěného 1 mM roztoku 4-MC a naředili jej s 90 μ L vody za vzniku 100 μ M roztoku.

Dále se postupovalo stejně jako u AA podle rovnice $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$.

4.2 Přidání fluorochromů

Po vytvoření roztoků krve s aktivátory (AA) a inhibitory (4-MC) agregace se do všech zkumavek přidají fluorochromy. Výjimkou je blank, kde se ve zkumavce nachází pouze čistá krev. K té přidáme místo fluorochromů 15 μ L fyziologického roztoku. Po přidání fluorochromů ke vzorkům je necháme 30 minut inkubovat ve tmě.

Fluorofor je molekula, díky které buňky fluoreskují. Fluorescence je jev, kdy molekula po excitaci elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce při návratu do základního stavu vyzáří energii ve formě fotonu.

Může se jednat o malou molekulu, organickou sloučeninu nebo celý protein. Bývá k molekule připojen kovalentně a díky němu můžeme jednotlivé molekuly detekovat. Nejčastěji bývá připojen například na protilátky, peptidy nebo NK. Takto konjugované protilátky jsou pak používány k detekci extra- i intracelulárních molekul jako jsou například peptidy, cytoskelet, cytokiny nebo DNA. Následně se navážou na molekulu, ke které je specifické a jsou detekovány na průtokovém cytometru. Prostřednictvím laseru dochází k excitaci fluoroforu. Každý fluorofor má své typické excitační a emisní spektrum, a to je detekováno detektorem.³⁸

Při provádění našeho experimentu jsme používali fluorochromy CD14 a CD45 pro detekci monocytů a fluorochrom CD41 pro detekci trombocytů. Informace o použitých fluoroforech včetně jejich excitačních a emisních délkách naleznete v **tabulce č. 2**.

Fluorochromy jsou fluorescenční barviva přirozeně se vyskytující nebo uměle vytvořená, které mohou být excitovány světlem (energií) o určité vlnové délce a následně vyzařují světlo o nižší energii a delší vlnové délce.³⁹

Vlnová délka, při které je fluorochrom excitován, a světelné spektrum, které vyzařuje (tzv. emisní profil), jsou charakteristickými znaky každého fluorochromu.

V průtokové cytometrii musí být fluorescenční profil každého fluorochromu kompatibilní s optickou konfigurací průtokového cytometru, aby byl správně detekován (tj. účinně excitován a jeho emisní světlo je optimálně detekováno).⁴⁰

Fluorochromy používané ve vícebarevné průtokové cytometrii (MFC = multi-color flow cytometry) patří podle své povahy do jedné z následujících skupin:⁴⁰

- a) malé molekuly – fluorescein isothiokyanát (FITC), kyaniny (Cy)
- b) velké molekuly na bázi proteinů – alophycocyanin (APC), fykoerythrin (PE), peridininový chlorofyl protein (PerCP)
- c) konstruované polymery – brilantní modř (FCF)
- d) nanokrystaly – quantum dots (= Qdots)

Kromě toho je běžně používanou strategií pro zvýšení počtu fluorochromů excitovaných stejným laserem, ale emitujících v odlišných částech spektra, vytváření tzv. tandemových sloučenin, které zvyšují vzdálenost mezi maximální excitační a emisní vlnovou délkou.

Příkladem tandemového fluorochromu je např. PerCP-Cy5,5 pro monocyty a granulocyty. (seznam nejčastěji využívaných fluorochromů najdete v **tabulce č.1**)

Tabulka č. 2: *Fluorochromy užívané k identifikaci monocytů a trombocytů*

Fluorofory	Konjugace	Cíl	Excitace (nm)	Emise (nm)
CD14	PE-Cy7	Monocyty	496	785
CD41	FITC	Trombocyty	488	520
CD45	PerCP-Cy5,5	Pan-leukocyt marker	482	678

4.3 Přidání RBC, centrifugace a přidání PBS

RBC (= red blood cell lysing buffer) je koncentrovaný pufr na bázi chloridu amonného. Používá se pro lýzu červených krvinek (erytrocytů) v suspenzi s malým nebo žádným účinkem na buňky s jádrem. Neobsahuje žádné fixační činidlo, takže buňky zůstávají po lýze červených krvinek životaschopné.

Připravuje se rozpuštěním 8,3 g chloridu amonného, 1,0 g hydrogenuhličitanu draselného a 1,8 ml 5 % EDTA v 800 ml destilované vody. Tento roztok se sterilizuje pomocí filtru s velikostí pórů 0,2 μm a doplní se destilovanou vodou na 1000 ml, vznikne tedy 10 koncentrovanější roztok.

My v laboratoři už RBC připravený měli, jen jsme jej naředili v poměru 9:1 s destilovanou vodou.

Do každé zkumavky jsme napipetovali 800 μL RBC, protřepali na třepačce Vortex a nechali inkubovat 10 minut v lednici při teplotě 2-8 $^{\circ}\text{C}$.

Poté následuje proces centrifugace. Všechny zkumavky jsme vložili do laboratorní centrifugy (odstředivky) na 5 minut, 500 rpm, v režimu without brakes (bez brzd) při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$. Tento proces funguje na principu oddělení různých látek pomocí odstředivé síly a provádí se, aby nedošlo k aktivaci destiček. U vzorků krve je potřebný k oddělení tzv. supernatantu, což je tekutina nad sedimentem, obsahující například krevní plazmu. Supernatant je potřeba opatrně odsát.

Posledním krokem před měřením je přidání PBS (= phosphate buffered saline). Jedná se o fosfátový roztok s 0,15M chloridem sodným. Je to v podstatě pufovaný fyziologický roztok. Jeho funkcí je úprava pH v oblasti kolem 6-8,5, tedy v neutrální a mírně zásadité oblasti. Podstatou nárazníkové funkce fosfátového pufru je kyselina fosforečná a fosforečnanové soli.

My ke každému vzorku našeho sedimentu napipetovali 400 μL PBS, což vedlo k resuspendování buněk v sedimentu. Vzorky jsme skladovali v lednici a ve tmě až do měření na průtokovém cytometru.

4.4 Měření na průtokovém cytometru

Nejprve zapneme počítač, ke kterému je připojen průtokový cytometr se softwarem Spectral Analyzer (SA) 3800. (Obr. 16)

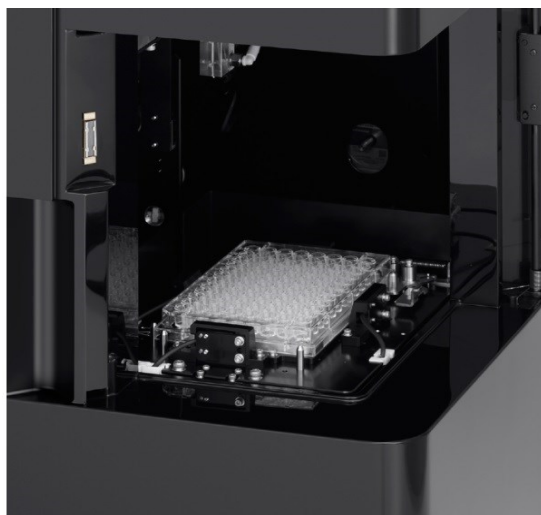


Obr. 16: Spectral analyzer 3800

<https://www.ita-intertact.com/spektralni-prutokovy-cytometr-sa3800/>

První fází je tzv. priming, který trvá okolo 10 minut a provádí se před ještě během přípravy vzorku. Slouží k tomu, aby se přístroj připravil na práci a došlo k odstranění vzduchových bublin. Spustí se dvojitým zmáčknutím tlačítka PRIME.

Do 96-jamkové destičky jsme napipetovali naše vzorky, každý dvakrát (z důvodu dvojité kontroly), a vložili je do autosampleru.



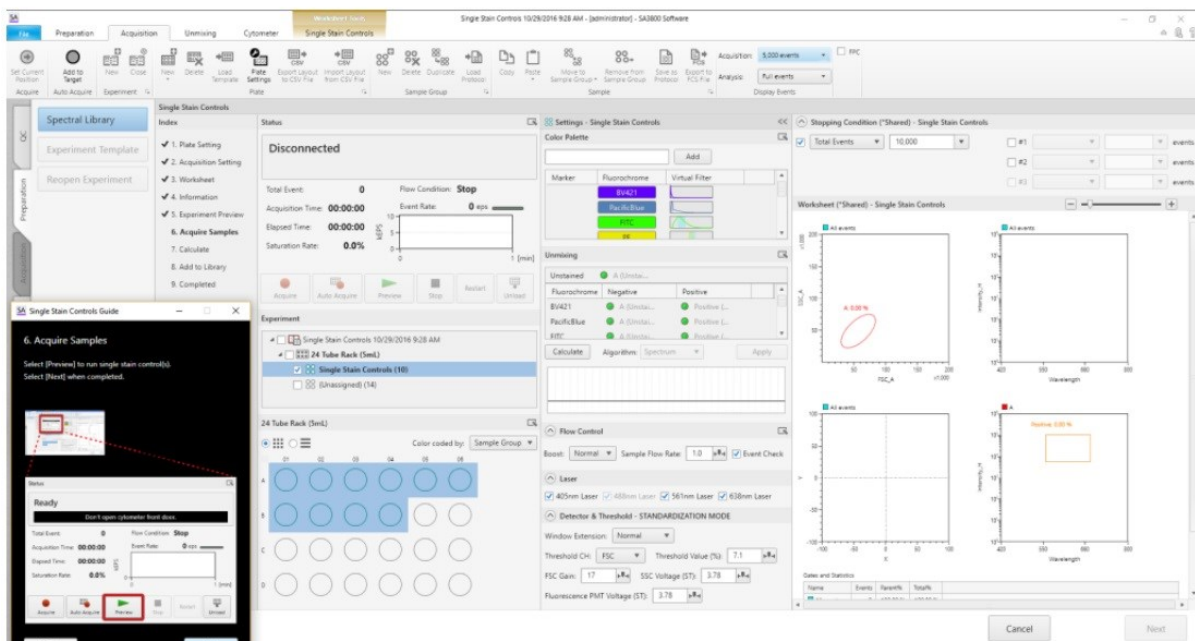
Obr. 17: 96-jamková destička

<http://www.jiangwenbio.com/?m=home&c=View&a=index&aid=60>

4.4.1 Nastavení podmínek

V knihovně spekter (Spectral library) jsme si navolili vybraná činidla, pro jednotlivé flouochromy a buňky. My si zvolili fluorochrom PerCP-Cy5,5 pro CD45, PE-Cy7 pro CD14 a FITC pro CD41.

Všechny funkce, včetně nastavení přístroje, se ovládají z okna Acquisition. (Obr. 17) Nástroje pracovního listu umožňují zvolit způsob zobrazení dat (například typy grafů) a přizpůsobit je svým potřebám analýzy.



Obr. 17: Okno Acquisition k nastavení podmínek měření

<https://cytometry.cytosens.com/sa3800-spectral-analyzer/>

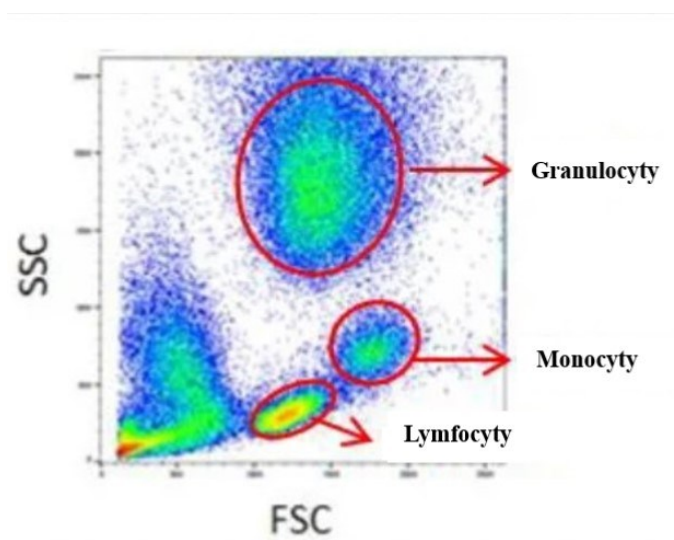
Vytvořili jsme si vlastní podmínky pro měření a to:

- Events 100 000 (nebo 250 000)
- Threshold value 16,7
- FSC gain 17%
- SSC voltage 30
- FSC voltage 70

4.4.2. Gating

Poslední částí práce na PC je gating. Ten považujeme za základní princip analýzy na průtokovém cytometru a je součástí tzv. datové analýzy. Umožňuje nám identifikovat jednotlivé typy buněk pomocí markerů, které jsou vizualizovány fluorescencí v jedinečném emisním spektru.

První krok je užitečný k identifikaci buněk našeho zájmu. Jedná se o poměr FSC a SSC. Na ose x je umístěno FSC a na ose y SSC. SSC rozděluje buňky podle granularity a komplexity, FSC podle velikosti. Nejprve si v grafu „zagatujeme“ buď celou buněčnou populaci nebo každou populaci zvlášť, pokud už teď víme, o jaké populaci se bude jednat. To můžeme vidět například na **Obr. 18**. Interpretace tohoto histogramu je tedy taková, že granulocyty jsou nejvíce komplexní a obsahují nejvíce granul, musí mít proto největší SSC. Monocyty jsou větší buňky než lymfocyty, proto mají větší FSC, a mají méně granul než granulocyty, proto mají menší SSC. A lymfocyty jsou buňky s nejmenší velikostí i granularitou.



Obr. 18: FSC a SSC graf při lýze červených krvinek v plné krvi

Upraveno podle: <https://www.bio-rad-antibodies.com/blog/a-guide-to-gating-in-flow-cytometry.html>

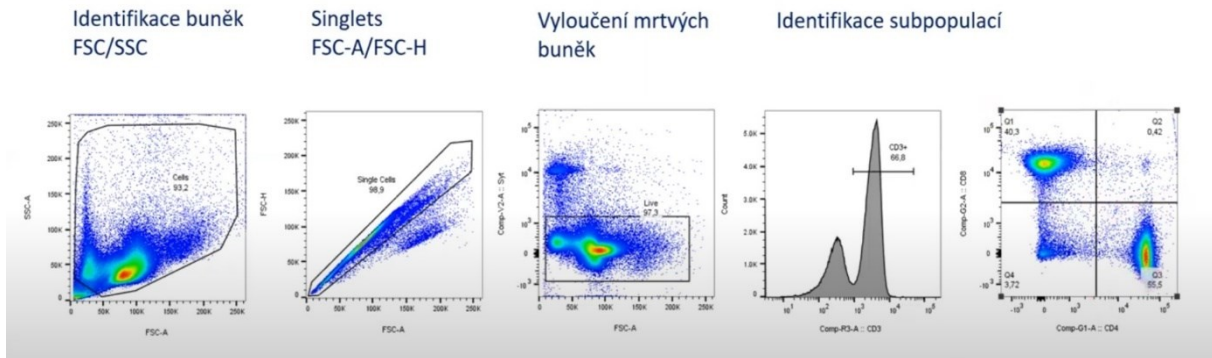
V dalším kroku si označíme už jen námi označené buňky za využití parametrů FSC-A/FSC-H (Area/Height = Plocha/výška). V tomto grafu uvidíme, že buňky stejné populace jsou v diagonále a mají relativně stejný poměr plochy a výšky, zatímco nějaké agregáty či dublety mají větší plochu než výšku, takže je můžeme vyloučit. Vytváříme zde tzv. singlety.

Třetí krok se nazývá vyloučení mrtvých buněk. Vezmeme jednotlivé buňky a zobrazíme si například rozptyl světla proti intenzitě barvení barvou pro mrtvé buňky (např. DNA barvivo,

keré prochází jen poškozenou membránou a obarví DNA mrtvých buněk). Zůstanou nám tedy jen živé buňky.

Posledním krokem je identifikace subpopulací. Ta se provádí tak, že se proti sobě dají buněčné markery jednotlivých populací a zjišťuje se procentuální zastoupení buněk v jednotlivých kvadrantech. Postupně se tak postupuje i pro další markery v experimentu.

Příkladem může být například identifikace pozitivních T-lymfocytů. (**Obr. 19**)



Obr. 19: „Gating“ strategie

Převzato z: <https://www.youtube.com/watch?v=JN2yzDMady0&t=195s>

4.5. Statistická analýza

Všechna data jsou prezentována jako průměr \pm SD. Výskyt PMA byl porovnán a analyzován pomocí one-way ANOVA s následným Dunnettovým t-testem nebo Studentovým t-testem.

5 VÝSLEDKY

Naší studie se zúčastnilo 14 pacientů, 7 mužů a 7 žen ve věku od 22 do 42 let. (**Tabulka č. 3**)

Tabulka č. 3: *Přehled dárců podle pohlaví a věku*

Věk	Dárci	
	Muži	Ženy
20-29	5	7
30-39	1	0
40-49	1	0
Celkem	7	7

Dalším zkoumaným faktorem v této diplomové práci je hodnota BMI (Body Mass Index), který se vypočítá podle následující rovnice: tělesná váha (kg) / tělesná výška na druhou (m). V **tabulce č. 4** naleznete rozepsané jednotlivé hodnoty BMI a jejich význam.

Tabulka č. 4: *Rozdělení hodnot BMI*

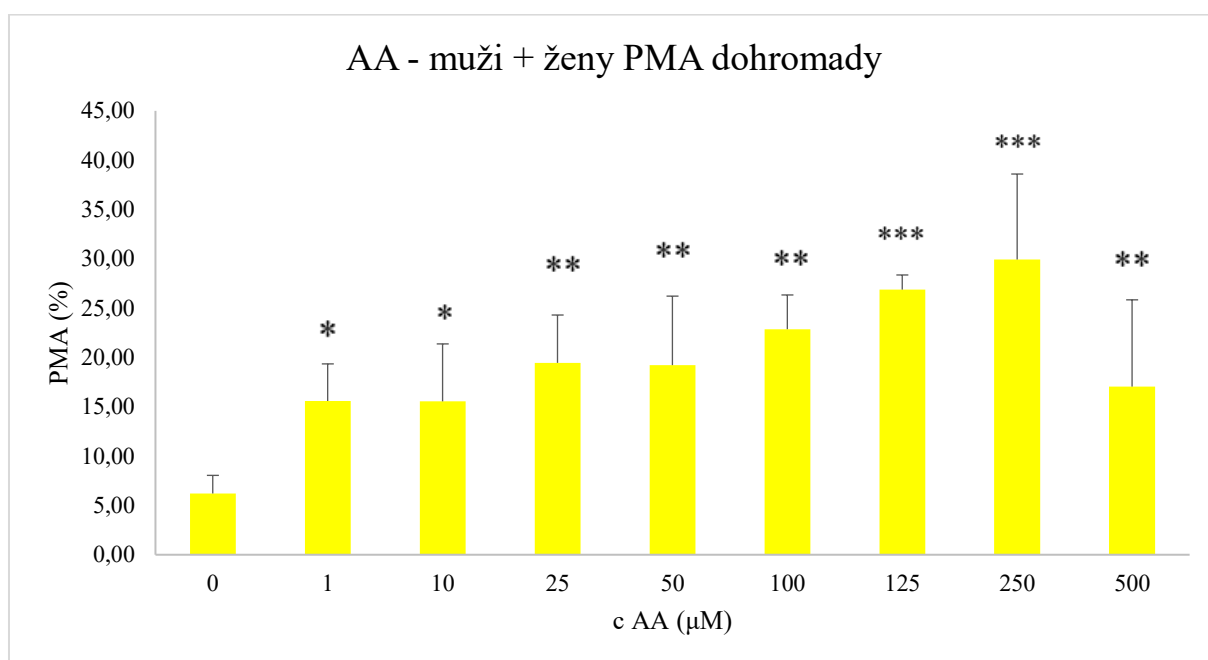
BMI	Kategorie
méně než 18,5	podváha
18,5-24,9	norma
25,0-29,9	nadváha
30,0-34,9	obezita 1. stupně
35,0-39,9	obezita 2. stupně
40,0 a více	obezita 3. stupně

V této práci nás zajímalo, jestli má tělesná váha pacienta vliv na tvorbu agregátů PMA.

5.1. Výsledky PMA za použití AA

Nejprve jsme měřili hodnotu PMA v čisté krvi jen za použití AA, jakožto aktivátoru agregace, a to v různých koncentracích. Konkrétně se jednalo o tyto koncentrace – 1 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM, 125 μM, 250 μM a 500 μM.

Výchozí hodnotou pro náš experiment je hodnota PMA tzv. blanku (v grafu č. 1 označen jako 0), což je pouze vzorek čisté krve s PBS, bez aktivátoru agregace. Průměrná hodnota PMA je v tomto případě 6,10 %. **(Graf č. 1)**

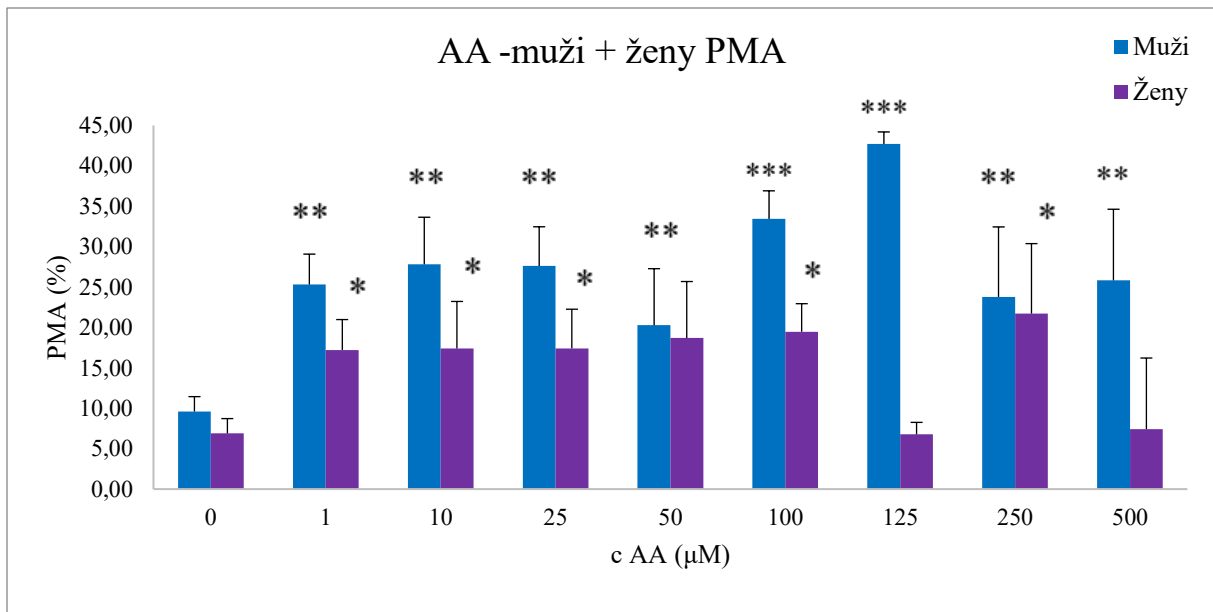


Graf č. 1: Průměrné hodnoty PMA za použití AA u mužů a žen

Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Z průměrných hodnot všech zúčastněných pacientů, mužů i žen, vyplývá, že nejsilněji reagovala AA při koncentraci 250 μM, kdy byla naměřena průměrná hodnota PMA 29,93 %.

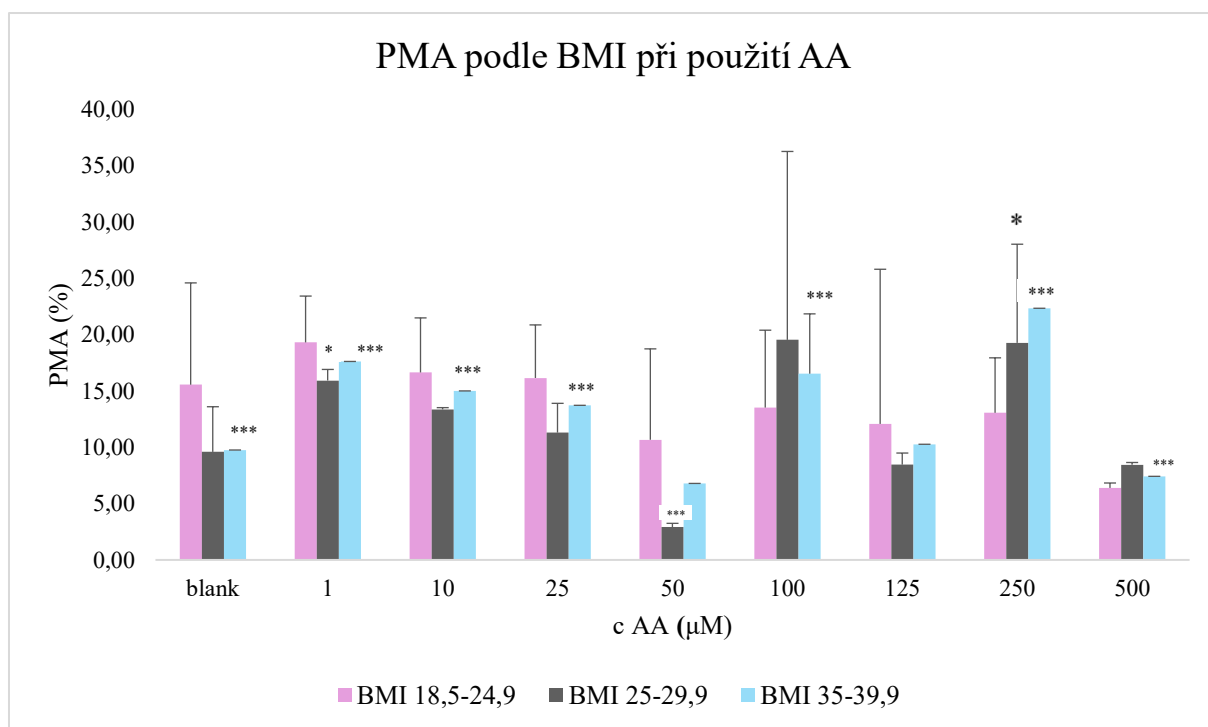
Následně jsme ale pacienty rozdělili podle pohlaví, a došli jsme k závěru, že u mužů byla nejsilnější agregace naměřena už při koncentraci 125 μM, kdy jsme zaznamenali průměrnou hodnotu PMA 42,71 %. Za to u žen vážně došlo k nejsilnější agregaci při koncentraci 250 μM, kdy hodnoty PMA dosáhly v průměru 21,71 %. **(Graf č. 2)**



Graf č. 2: Porovnání naměřených hodnot PMA mezi muži a ženami za použití AA
 Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$,
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Z výsledků také vyplývá, že při našem měření obecně došlo k silnější agregaci u mužů, protože ve všech námi naměřených koncentracích byly zjištěny vyšší průměrné hodnoty PMA než u žen. Největší rozdíl byl naměřen u koncentrace 125 μM , kdy se hodnoty PMA mezi muži a ženami lišily o 35,93 %. Naopak nejvyrovnanější hodnoty PMA byly naměřeny u koncentrace 50 μM , kdy se rozdíl mezi muži a ženami lišil jen o 1,59 %.

Při měření PMA za použití AA, jsme měli k dispozici pacienty ve 3 kategoriích BMI, a to konkrétně 18,5-24,9, 25-29,9 a 35-39,9. U tohoto měření se jednotlivé naměřené hodnoty u jednotlivých kategorií BMI podstatně lišily. Nejvyšší naměřenou hodnotou celkově byla hodnota PMA 22,34 %. Ta byla naměřena u koncentrace 250 μM u pacienta s BMI 35-39,9. U této koncentrace taky můžeme obecně říct, že u ní byly v průměru naměřeny nejvyšší hodnoty PMA. Naopak průměrně nejnižší hodnoty byly zjištěny u koncentrace 500 μM . Nejnižší koncentrace vůbec byly naměřena při koncentraci 50 μM u pacienta s BMI 25-29,9. Jednalo se o hodnotu 2,92 %. (**Graf č. 3**)



Graf č. 3: Porovnání hodnota PMA podle BMI za použití AA

Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$,

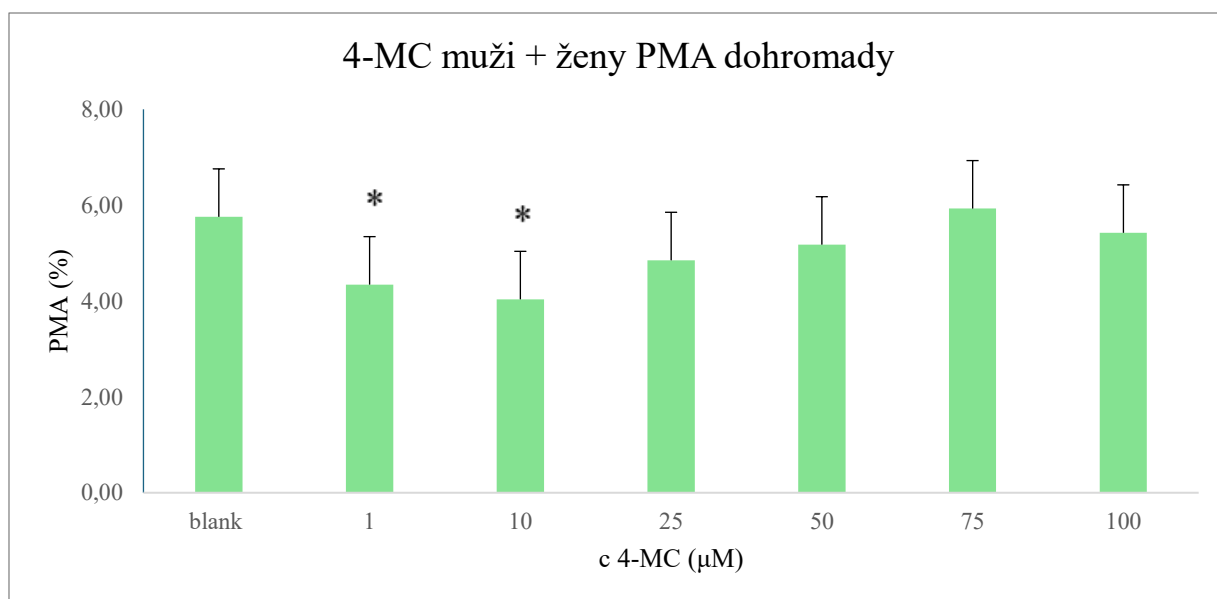
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

5.2. Vliv 4-MC na vznik PMA

Další částí tohoto experimentu bylo zjistit hodnotu PMA po inkubaci 4-MC, který je považován za inhibitor aktivace agregace. Použili jsme následující koncentrace 4-MC – 1 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 75 μM a 100 μM. Cílem bylo prokázat, zdá má 4-MC nějaký vliv na vznik těchto PMA *in vitro*.

Jelikož se jedná o inhibitor aktivace agregace, předpokládalo se naměření hodnot nižších, než tomu bylo u AA při stejných koncentracích.

Nejdříve jsme hodnotili, zda má samotný 4-MC nějaký vliv na vznik PMA. Nepatrně nejsilnější PMA bylo naměřeno u koncentrace 75 μM, a to 5,93 %. Naopak nejnižší PMA byla zjištěna u koncentrace 10 μM, a to 4,04 %. (**Graf č. 4**)

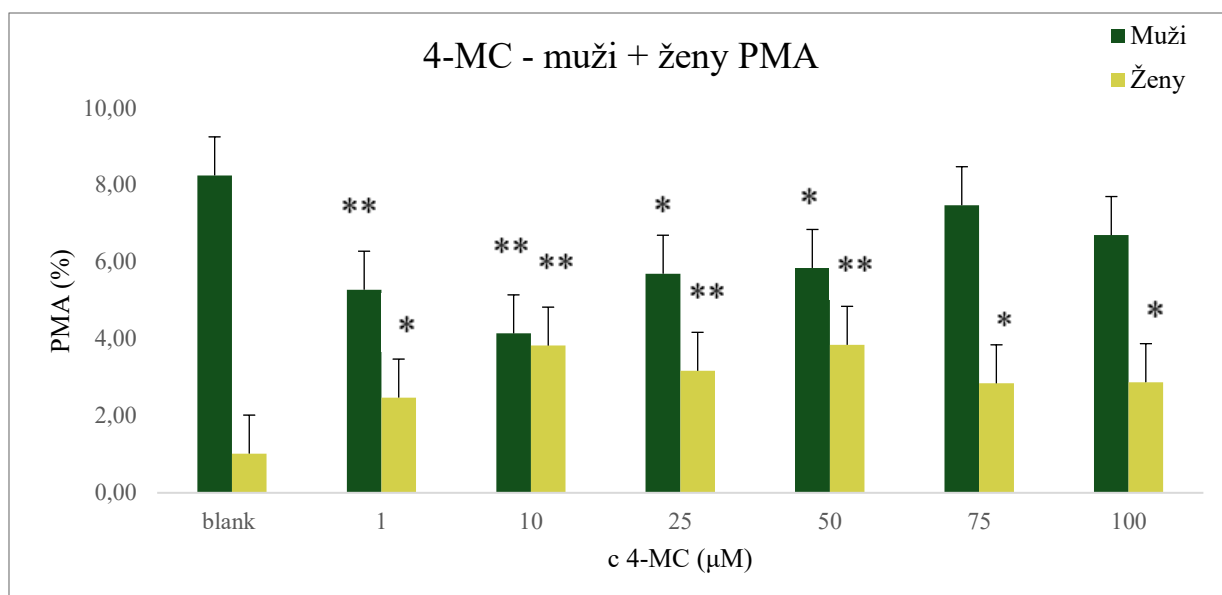


Graf č. 4: Průměrné hodnoty PMA za použití 4-MC u mužů a žen

Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

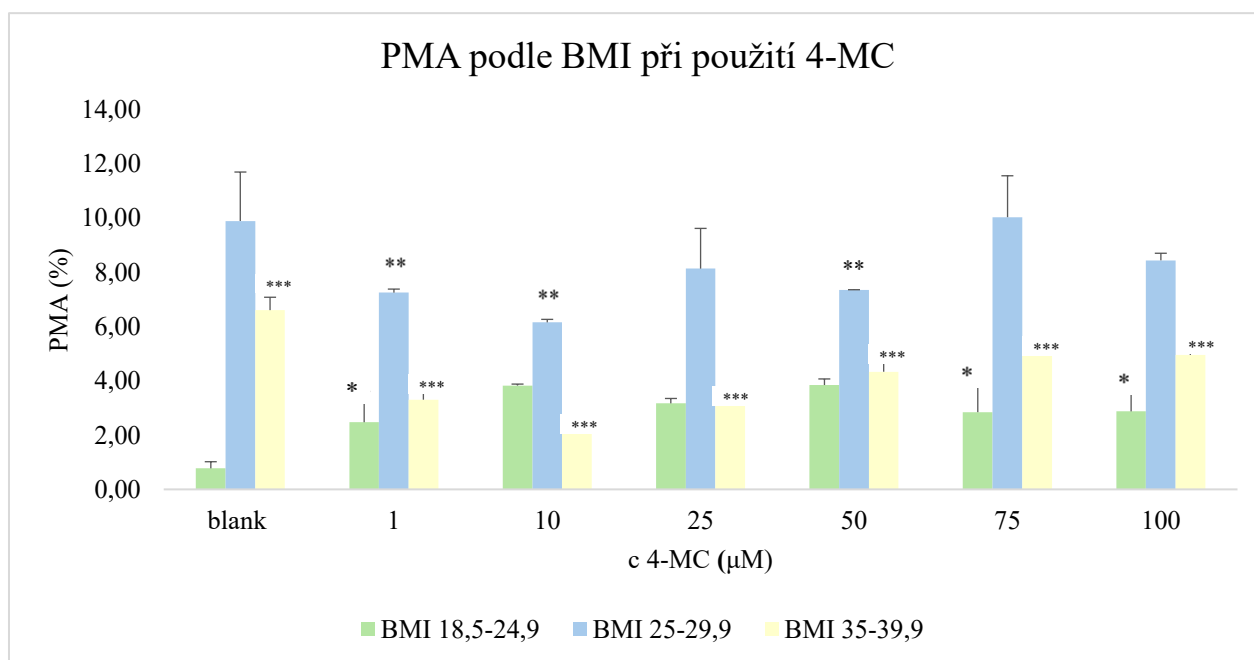
Co se týče porovnání naměřených hodnot mezi pohlavími, tak u mužů byly stejně jako v případě AA, naměřeny vyšší hodnoty PMA. Nejvyšší zjištěnou hodnotou PMA u mužů byla hodnota PMA blanku, která dosáhla 8,25 %. Nejnižší hodnota PMA byla vypočítána u koncentrace 10 μM , a to 4,14 %. **(Graf č. 5)**

U žen byly změřeny hodnoty podstatně nižší. Hodnoty všech koncentrací byly přibližně stejné a pohybovaly se v rozmezí 2,50 – 4,00 %, s výjimkou blanku, kde byla naměřena hodnota PMA pouze 1,02 %. Nepatrně nejvyšší hodnota byla dosažena při koncentraci 50 μM , a to 3,85 %. Největší rozdíl byl naměřen u blanku, a to konkrétně 7,23 %.



Graf č. 5: Porovnání naměřených hodnot PMA mezi muži a ženami za použití 4-MC
 Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$,
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Co se týče rozdělení hodnot PMA podle BMI pacientů, tak při měření za použití 4-MC jsme došli k celkem jednoznačným výsledkům. Nejvyšší hodnoty PMA u všech koncentrací byly naměřeny u pacientů s BMI 25-29,9. Nejvyšší hodnota PMA byla naměřena u koncentrace 75 μM, a to 10,03 %, těsně následována hodnotou PMA blanku, a to 9,89 %. (Graf č. 6)

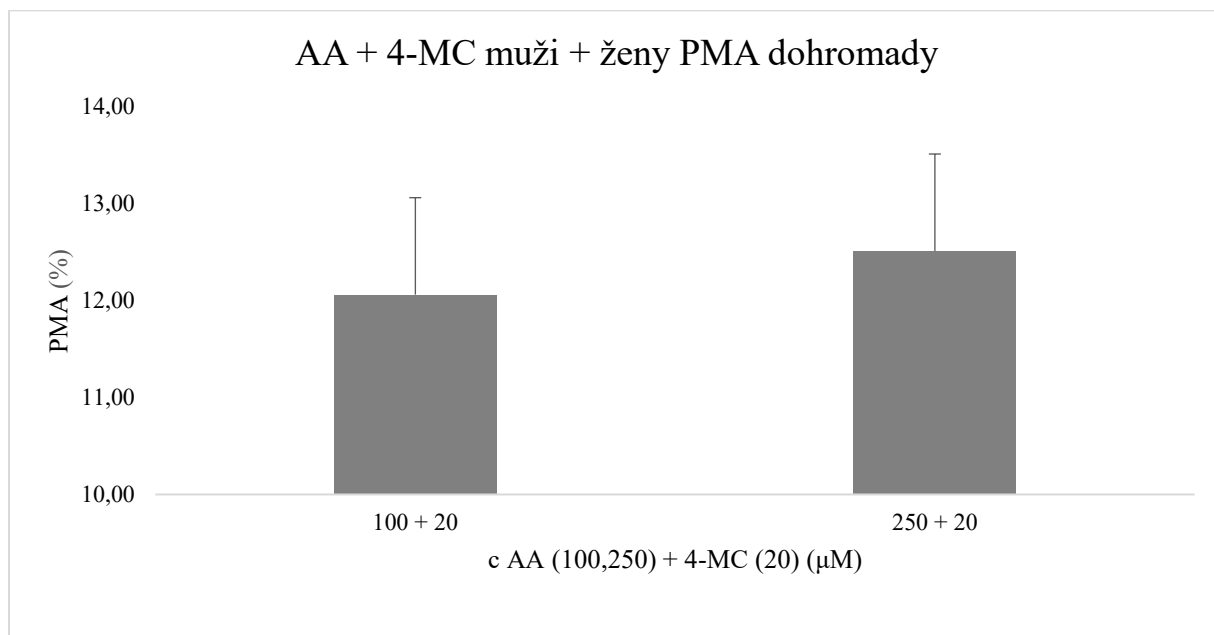


Graf č. 6: Porovnání hodnoty PMA podle BMI za použití 4-MC
 Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$,
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

5.3. Výsledky PMA za použití AA + 4-MC

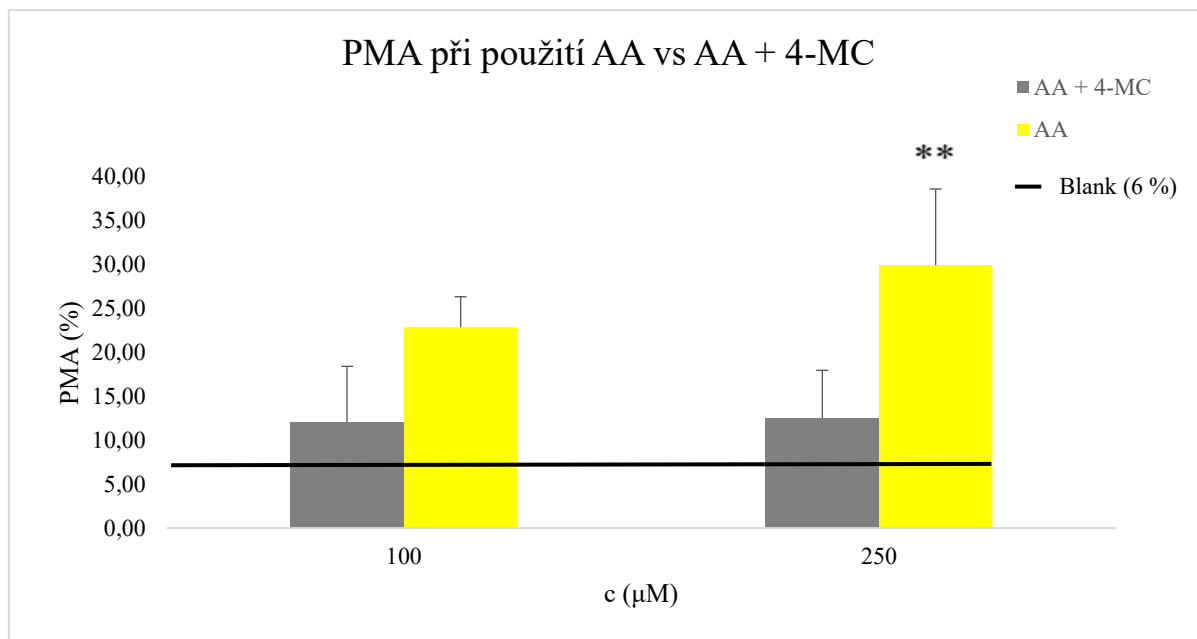
Poslední částí tohoto experimentu zahrnovalo k zjištění hodnot PMA použití jak aktivátoru, tak i inhibitoru agregace, tedy AA dohromady s 4-MC. AA jsme používali v koncentracích 100 μM a 250 μM a 4-MC v koncentraci 20 μM .

Z naměřených hodnot jsme zjistili, že k nepatrně větší tvorbě agregátů došlo u koncentrace 250 μM , a to 12,51 %. Hodnota PMA u koncentrace 100 μM byla 12,06 %. **(Graf č. 7)**



Graf č. 7: Hodnoty PMA naměřené při použití aktivátoru (AA) a inhibitoru aktivace agregace (4-MC)

Pokud tyto hodnoty porovnáme s hodnotami naměřenými při samostatném použití AA o stejné koncentraci, zjistíme, že hodnota PMA u koncentrace AA 100 μM byla 22,86 % a u koncentrace 250 μM 29,93 %. Hodnoty PMA se tedy díky použití inhibitoru 4-MC snížily u koncentrace 100 μM o 47,00 %, a u koncentrace 250 μM dokonce o 58,00 %. **(Graf č. 8)**

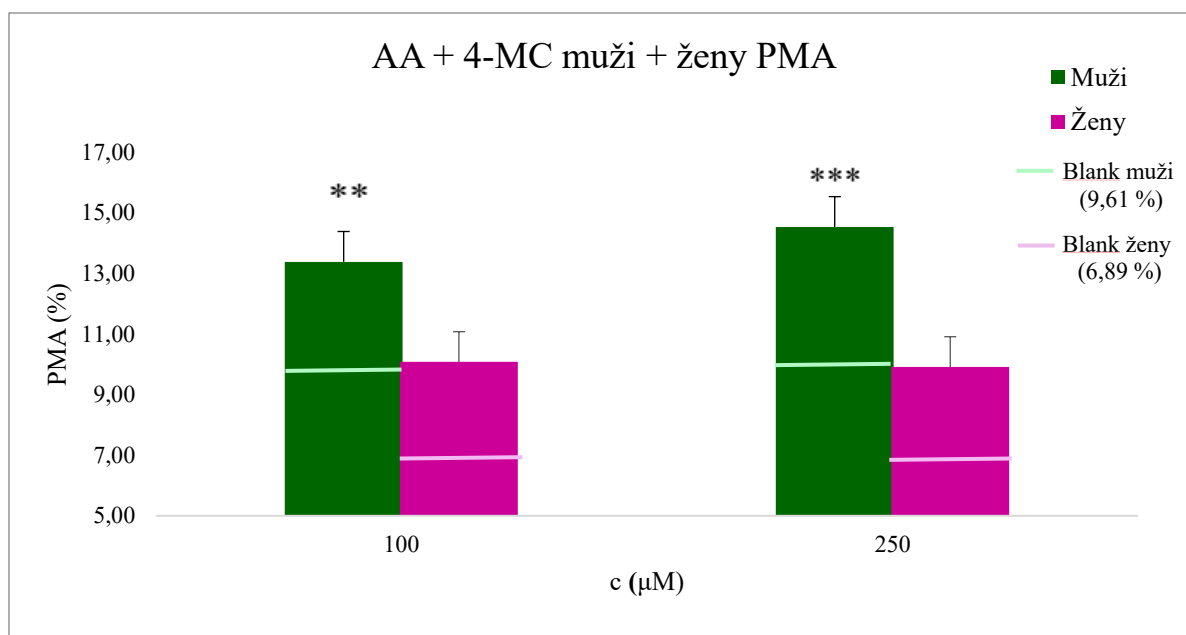


Graf č. 8: Porovnání naměřených hodnot PMA při použití pouze aktivátoru agregace (AA) versus při použití AA i inhibitoru agregace (4-MC)

Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

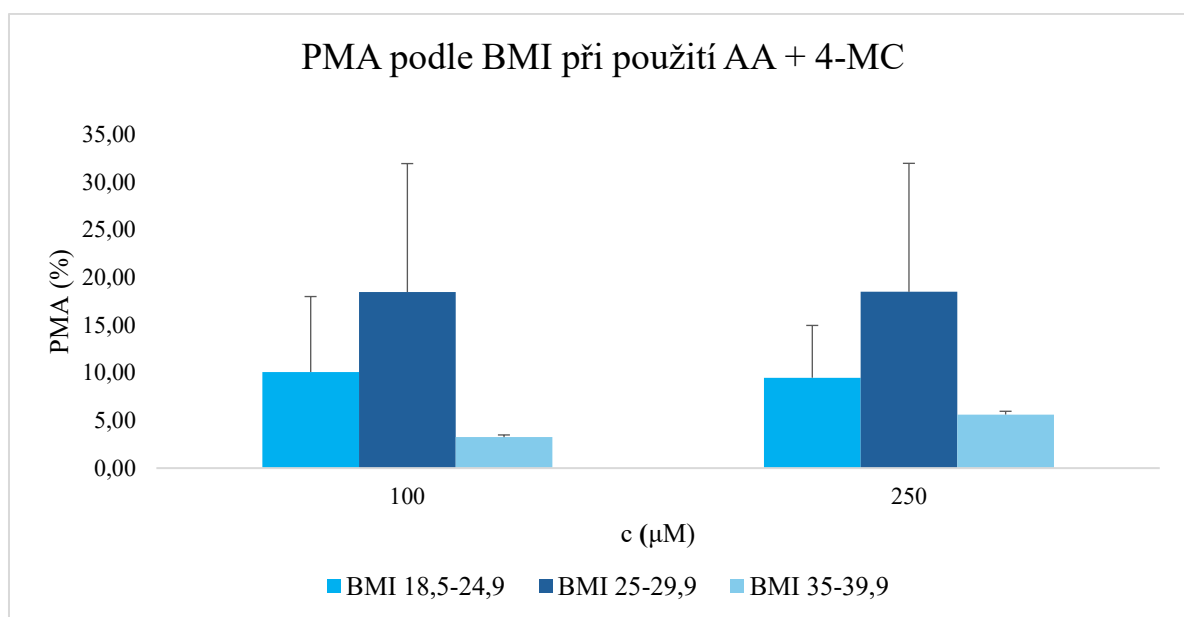
Co se týká pohlaví, tak při tomto měření se výsledky mezi muži a ženami odlišovaly. U mužů byly naměřeny vyšší hodnoty u koncentrace 250 µM, a to konkrétně 14,53 %. U žen byla naopak naměřena o něco vyšší hodnota PMA u koncentrace 100 µM, a to 10,08 %. U obou pohlaví byly ale rozdíly velmi těsné, u mužů se hodnoty lišily pouze o 0,92 % a u žen dokonce jen o 0,09 %.

Při porovnání hodnot PMA mezi muži a ženami i v tomto měření vyšlo, že vyšší hodnoty agregace byly naměřeny u mužů. Při koncentraci 100 µM se jednalo v průměru o rozdíl 3,30 % a u koncentrace 250 µM o rozdíl 4,61 %. (**Graf č. 9**)



Graf č. 9: Porovnání naměřených hodnot PMA mezi muži a ženami za použití AA + 4-MC
 Statistický test one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (* $p < 0.05$,
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Při rozdělení pacientů podle hodnot jejich BMI jsme také v tomto případě došli k závěru, že k suverénně nejsilnější agregaci došlo u pacientů s BMI 25-29,9. U této hodnoty BMI byly naměřené hodnoty PMA u obou koncentrací, tedy 100 μM i 250 μM, téměř totožné. Jednalo se konkrétně o hodnoty 18,45 % pro 100 μM a 18,48 % pro 250 μM. Naopak nejnižší PMA bylo u obou měřených koncentrací zjištěno u pacienta s BMI 35-39,9. (**Graf č. 10**)



Graf č. 10: Porovnání hodnot PMA podle BMI za použití AA + 4-MC

6 DISKUZE

Kyselina arachidonová (AA) patří mezi nenasycené mastné kyseliny. Je prekurzorem syntézy eikosanoidů, mezi které patří například prostacykliny, leukotrieny nebo thromboxany. K této syntéze dochází díky působení enzymu fosfolipázy A₂, kdy se arachidonát uvolní z buněčné membrány. Tento děj je významný zejména u léčby zánětlivých stavů pomocí kortikosteroidů, kdy dochází k inhibici fosfolipázy A₂, a tím pádem také k nižší produkci AA.⁴¹ Její další funkcí je, že ji řadíme k aktivátorům agregace trombocytů s monocyty, tzv. PMA. Samotná AA není aktivace schopna, ale díky své přeměně na tromboxan 2, který působí jako silné proagregační činidlo, se tak při měření PMA využívá.

Výchozí hodnotou pro měření byla hodnota tzv. blanku (čistá krev + PBS + fluorochrom), u které byla naměřena hodnota PMA 6,10 %. **(Graf. č.1)** Z grafů můžeme vyčíst, že s přidáním aktivátoru agregace, tedy AA, se hodnoty PMA zvýšily se zvyšující se koncentrací. Výjimkou jsou hodnoty PMA naměřené u žen při koncentracích 125 μM a 500 μM, kdy jsou hodnoty nižší. Za příčinu můžeme u koncentrace 125 μM považovat nejspíš chybu v měření. U koncentrace 500 μM to může být tím, že už je pro buňky hodně silná, a většina z nich nepřežije. Nejlepší výsledky byly naměřeny u koncentrace 250 μM, která dosáhla hodnoty téměř 30,00 % PMA. V praxi by to znamenalo, že při této koncentraci došlo k aktivaci největšího množství trombocytů tím, že se navázaly na monocyty a staly se tak prozánětlivé a prokoagulační, což je klíčový ukazatel trombotických stavů v organismu.¹⁹ Naopak při koncentraci 500 μM došlo k výraznému poklesu tvorby agregátů, a to přibližně o 10,00 %. Tato koncentrace už může být pro tvorbu agregátů v organismu příliš vysoká.

Při rozdělení pacientů podle pohlaví **(Graf č. 2)** jsme došli k závěru, že k větší tvorbě PMA došlo u mužů, a to ve všech koncentracích. Nejvyšší výskyt PMA u mužů byl naměřen už u koncentrace 125 μM, a dosáhl hodnoty kolem 43,00 %. Taková to hodnota nebyla u žen dosažena v žádné z měřených koncentrací. Nejvyšší změřenou hodnotou PMA byla hodnota 21,71 % naměřena při koncentraci 250 μM. Tyto výsledky nemůžeme považovat za úplně přesné, jelikož bylo zjištěno, že trombocyty žen ve všech věkových kategoriích jsou citlivější na stimulaci agonisty než trombocyty mužů. Tato zvýšená reaktivita byla zjištěna u všech stimulantů agregace, nejvíce však u trombinového receptoru PAR1.⁴² Studiemi bylo zjištěno, že zvýšená reaktivita k stimulantům agregace u žen naznačuje, že se jedná o vnitřní vlastnost ženských trombocytů. Obecně mají ženy také větší množství trombocytů než muži, ale jejich zvýšená reaktivita je pozorována i po úpravě počtu buněk na stejné množství jako u mužů.

Reaktivita krevních destiček je zvýšená jak u zdravých pacientek, tak i u asymptomatických pacientek s rodinnou anamnézou předčasné ischemické choroby srdeční (CAD), pacientek s podezřením na infarkt myokardu nebo u pacientek podstupujících stentování.⁴³

Agregace pomocí AA by se dala dále podpořit použitím dalších aktivátorů agregace, jako je například ADP nebo kolagen. Byl proveden experiment na porovnání protideštičkových vlastností kolagenu a AA. Stimulovala se nejprve agregace AA, a poté i kolagenu. K nejsilnější korelaci došlo u vyšší koncentrace AA (200 μM) a nízkou koncentrací kolagenu kolagenu (0.16 $\mu\text{g/mL}$). Zajímavé je, že tato korelace byla prokázána i při použití AA v nižší koncentraci (60 μM), jen se slabšími výsledky.⁴⁴

Co se týče hodnot PMA při rozdělení pacientů podle BMI (**Graf č. 3**), tak nejvyšší hodnoty byly naměřeny v kategorii 35-39,9, která signalizuje obezitu 2. stupně. Nejvyšší hodnota PMA byla naměřena u koncentrace 250 μM , a to 22,34 %. Tyto výsledky vychází z faktu, že obezita je spojena s vysokým rizikem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění a také s rozvojem metabolického syndromu. Hyperreaktivita krevních destiček (tedy jejich aktivace) se podílí na urychlení rozvoje atherotrombózy, na které se podílí faktory jako je zánět, inzulínová rezistence, oxidativní stres nebo endotelová dysfunkce.⁴⁵

Dále byla studována protideštičková aktivita 4-methylcatecholu (4-MC). 4-MC je derivát kvercetinu, využívaný zejména pro své pozitivní účinky na nervovou tkáň nebo na léčbu neuropatické bolesti.²⁶

4-MC je také znám jako inhibitor agregace trombocytů. Mechanismus účinku této protideštičkové aktivity není zcela objasněn, ale ze studií vyplývá, že má spojitost s vápníkovými signálními dráhami. Bylo také zjištěno, že k největšímu poklesu tvorby agregátů došlo při společném použití 4-MC s ASA, a to už při velmi nízkých koncentracích. Je to dáno tím, že ASA na rozdíl od 4-MC inhibuje COX-1, tedy jedinou formu cyklooxygenázy přítomnou v trombocytech. Tento výsledek by mohl mít několik možných vysvětlení; 4-MC buď působí zcela nezávisle na kaskádě založené na AA, nebo zasahuje do dalšího kroku, přeměny prostaglandinu na prostaglandin H₂ (PGH₂).²⁶

V tomto experimentu byl použit 4-MC v 6 různých koncentracích – 1, 10, 25, 50, 75 a 100 μM . Naším cílem bylo prokázat, zda samotný 4-MC má nějaký vliv na tvorbu agregátů PMA *in vitro*. To se prokázat dokázalo, jelikož 4-MC ve všech použitých koncentracích vykázal určité procento tvorby agregátů. Naměřené hodnoty byly nižší než u AA, to se ale dalo očekávat, jelikož se jedná o inhibitor agregace. Bylo ale zjištěno, že 4-MC je účinnější než kyselina

acetylsalicylová (ASA), a to jak na agregaci vyvolanou AA, tak i kolagenem. Jeho klinicky relevantní účinek byl prokázán už při koncentraci 10 μM , který odpovídá přibližně účinku ASA v koncentraci mezi 30 až 70 μM .²⁶

Jako nejsilnější vyšla z našeho měření koncentrace 75 μM , která dosáhla hodnoty 8,25 %. (**Graf č. 4**). Při této koncentraci byla tedy prokázána nejvyšší protideštičková aktivita 4-MC, jelikož došlo k tvorbě největšího množství PMA, a tedy k rozvoji největšího množství prozánětlivých faktorů. Vyšší koncentrace (100 μM) se už může jevit jako příliš vysoká pro tvorbu PMA.

Opět došlo k vyšší tvorbě PMA u mužů než u žen (**Graf č. 5**), a při tomto měření byly naměřeny nejvyšší hodnoty u BMI 25-29,9 (nadváha) (**Graf č. 6**).

V poslední části jsme zkoumali tvorbu PMA za použití jak AA, tak i 4-MC současně. U AA byly použity koncentrace 100 μM a 250 μM , u 4-MC koncentrace 20 μM (**Graf č. 7**), protože u této koncentrace byla studiemí za pomoci korelací s AA zjištěna nejsilnější antiagregační aktivita.⁴¹

I v tomto případě byla zjištěna přítomnost PMA, ale při porovnání se stejnými koncentracemi samotné AA, byly hodnoty podstatně nižší, a to přibližně o 50,00 % u obou koncentrací (**Graf č. 8**). Nedošlo tedy k úplné inhibici agregace, a protideštičkový efekt 4-MC můžeme prokázat i při tomto měření. Může to být, ale vysvětleno i ne úplně perfektním zpracováním vzorku, jelikož destičky jsou velmi citlivé a mohou se samy spontánně aktivovat.

I v tomto měření byly zjištěny vyšší hodnoty PMA u mužů než u žen (**Graf č. 9**), ale rozdíl mezi hodnotami jednotlivých koncentrací byl vcelku zanedbatelný, nepatrně vyšších hodnot bylo dosaženo u koncentrace 250 μM . U mužů byla naměřena nejvyšší hodnota u koncentrace 250 μM , u žen už při koncentraci 100 μM . Při tomto měření můžeme říct, že byla prokázána vyšší citlivost ženských destiček na tvorbu PMA.

Při rozdělení pacientů podle BMI (**Graf č. 10**) byly opět nejvyšší hodnoty zjištěny v kategorii nadváha, tedy 25-29,9. Naopak překvapivě nejnižší hodnoty byly změřeny v kategorii 35-39,9, tedy obezita 2. stupně. Nejspíš se jedná o chybu v měření, jelikož je to v rozporu s ostatními výsledky.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla zkoumána kyselina arachidonová, jakožto aktivátor inhibice agregace trombocytů s monocyty (PMA), a to v různých koncentracích a v různých kategoriích (pohlaví, věk, BMI). Tvorba agregátů PMA byla prokázána ve všech použitých koncentracích. Jako nejsilnější se projevila koncentrace 250 μM . Při porovnání mezi pohlavími byly zjištěny vyšší hodnoty PMA u mužů, a to i při nižších koncentracích. Ze studií je známo, že krevní destičky žen jsou na tvorbu agregátů citlivější, a proto by u se u nich měly PMA tvořit při nižších koncentracích než u mužů. To se nám podařilo prokázat jen při současném použití AA a 4-MC. Mohlo to být způsobeno špatnou úpravou vzorku a mou nezkušeností v laboratoři.

Co se naopak prokázat dokázalo je to, že nejvyšších hodnot PMA bylo naměřeno u pacientů s vyšším BMI, tedy u pacientů s nadváhou (BMI 25-29,9) a pacientů s obezitou 2. stupně (BMI 35-39,9). U obézních pacientů je obecně vyšší riziko rozvoje aterosklerotických a kardiovaskulárních chorob, a s tím související tvorba zánětů a trombóz.

Dalším cílem bylo prokázat protideštičkovou aktivitu inhibitoru agregace, 4-methylcatecholu. Tento cíl se prokázat dokázalo, jako nejlepší se ukázala koncentrace 75 μM . Nikdy nedošlo k úplně inhibici agregace, hodnoty PMA byly oproti AA očekávaně nižší, ale můžeme říct, že 4-MC se dá k zabránění tvorby PMA používat.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. PECKA, Miroslav. Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín: FINIDR, 2006, 304 s. ISBN 80-86682-02-1.
2. KROLL, M . H., SCHAFER,A.I. The analysis of ligand-receptor interactions in platelet activation. In Joseph, M. (ed). Immunopharmacology of platelets. London: Academie Press , 1995, s. 31-65.
3. LAPETINA EG, SIEGEL FL. Shape change induced in human platelets by platelet-activating factor. Correlation with the formation of phosphatidic acid and phosphorylation of a 40,000-dalton protein. J Biol Chem. 1983 Jun 25;258(12):7241-4. PMID: 6345519.
4. SCHROIT AJ, ZWAAL RF. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. Biochim Biophys Acta. 1991 Nov 13;1071(3):313-29. doi: 10.1016/0304-4157(91)90019-s. PMID: 1958692.
5. ROTH, G. J. Developing relationship: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib and leucine-rich glycoproteins. Blood, 1991, roč. 77, str. 5
6. PHILLIPS, D. R., SHUMAN, M. A. Biochemistry of platelets. Orlando: Academie Press, 1986.
7. HE J, FORD HC, CARROLL J, DOUGLAS C, GONZALES E, DING S, FEARNLEY IM, WALKER JE. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Mar 20;115(12):2988-2993. doi: 10.1073/pnas.1722086115. Epub 2018 Feb 12. PMID: 29440398; PMCID: PMC5866602.
8. JAKEWAY, CHARLES A., et al. Immunobiology. 5. vyd. [s.l.]: Garland Science, 2001
9. VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. Lékařská histologie I. Cytologie a obecná histologie. Druhé vydání. Univerzita Karlova: Karolinum, 2018. ISBN 978-80-246-4106-5
10. KITTNAR, Otomar. Lékařská fyziologie. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068- 4
- 11 MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. Medical microbiology. Elsevier Health Sciences, 2015
12. ROKYTA, Richard et al., 2002. Somatologie I. Praha: Eurolex Bohemia. ISBN 80-86432-30-0.

13. ZIEGLER-HEITBROCK L, ANCUTA P, CROWE S, DALOD M, GRAU V, HART DN, LEENEN PJ, LIU YJ, MACPHERSON G, RANDOLPH GJ, SCHERBERICH J, SCHMITZ J, SHORTMAN K, SOZZANI S, STROBL H, ZEMBALA M, AUSTYN JM, LUTZ MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. Epub 2010 Jul 13. PMID: 20628149.
14. NAVRÁTIL, Leoš. Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.
15. PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ a kolektiv. Hematologie a transfúzní lékařství I.: Hematologie. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-7192-2.
16. JÍLEK, Petr. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
17. LUKÁŠ, Karel, Aleš ŽÁK a kolektiv. Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-9012-1.
18. COILLARD A, SEGURA E. In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front Immunol*. 2019 Aug 13;10:1907. doi: 10.3389/fimmu.2019.01907. PMID: 31456804; PMCID: PMC6700358.
19. ROLLING CC, BARRETT TJ and BERGER JS (2023) Platelet-monocyte aggregates: molecular mediators of thromboinflammation. *Front. Cardiovasc. Med.* 10:960398. doi: 10.3389/fcvm.2023.960398
20. KRAL JB, SCHROTTMAIER WC, SALZMANN M, ASSINGER A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus Med Hemother*. 2016 Mar;43(2):78-88. doi: 10.1159/000444807. Epub 2016 Mar 9. PMID: 27226790; PMCID: PMC4872052.
21. BARNARD MR, LINDEN MD, FRELINGER AL 3rd, et al. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J Thromb Haemost*. (2005) 3(11):2563–70. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01603.x
22. SCHROTTMAIER WC, KRAL JB, BADRNYA S, ASSINGER A. Aspirin and P2Y12 inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb Haemost*. (2015) 114(3):478–89. doi: 10.1160/TH14-11-0943

23. MILLIE HUGHES-FULFORD, RAYMOND R. TJANDRAWINATA, CHAI-FEI LI, SINA SAYYAH, Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A 2 in prostate carcinoma cells , *Carcinogenesis*, Volume 26, Issue 9, September 2005, Pages 1520–1526
24. ROBERT K. MURRAY; DARYL K. GRANNER; JOE C. DAVIS; PETER A. MAYES; VICTOR W. RODWELL. *Harper's Illustrated Biochemistry*; twenty-sixth edition. [s.l.]: [s.n.], 2003. ISBN 0-07-138901-6
25. FLORASTINA PAYTON, RUMU BOSE, WILLIAM L. ALWORTH, ADDANKI P. KUMAR, RITA GHOSH, 4-Methylcatechol-induced oxidative stress induces intrinsic apoptotic pathway in metastatic melanoma cells, *Biochemical Pharmacology*, Volume 81, Issue 10, 2011, Pages 1211-1218, ISSN 0006-2952
26. HRUBŠA, M.; KONEČNÝ, L.; PACLÍKOVÁ, M.; PARVIN, M.S.; SKOŘEPA, P.; MUSIL, F.; KARLÍČKOVÁ, J.; JAVORSKÁ, L.; MATOUŠOVÁ, K.; KRČMOVÁ, L.K.; et al. The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action. *Nutrients* 2022, 14, 4798. <https://doi.org/10.3390/nu14224798>
27. ŠINKOROVÁ, Z. a ZÁRYBNICKÁ L. *Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda*. Hradec Králové, 2008
28. MARINOV I.: *Průtoková cytometrie v klinické hematologii; 2. přepracované a rozšířené vydání*; Triton, 2008, ISBN 978-80-7387-143-7
29. CRAIG F.E., FOON K.A.: *Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms*; Blood, 2008
30. STETLER-STEVENSON M.: *The Bethesda International Guidelines on Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematolymphoid Neoplasia*, 2006
31. CHAPMAN, Graeme. Instrumentation for flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2000, 243(1), 3-12.
32. NOLAN, John, Danilo CONDELLO a Erika DUGGAN. Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry. 2013, 253-264.
33. RAHMAN, Mischa. *Introduction to Flow cytometry*. Kidlington: MorphoSys UK Ltd, 2009, 4-32.
34. MAYER J., STARÝ J. a kol.: *Leukémie*; Grada Publishing, 2002, ISBN 80-7169-991-8

35. BURPEE, A. a P. NOBES. Flow Cytometry Analysis from Applied Cytometry makers of VenturiOne & StarStation. Applied Cytometry [online]. [cit. 21. 5. 2017]. Dostupné z: http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php
36. CHATTOPADHYAY, Pratip a Mario ROEDERER. Cytometry: Today's Technology and Tomorrow's Horizons. Methods. Bethesda, 2012, 57(3), 251-258.
37. ERMANN, Joerg, Deepak RAO TESLOVICH, Nikola C., Michael BRENNER a Soumya RAYCHAUDHURI. Immune cell profiling to guide therapeutic decisions in rheumatic diseases. Nature Reviews. Rheumatology. 2015, 11(9), 541-551.
38. LIU, JUNJIA, CHEN LIU A WEI HE. Fluorophores and Their Applications as Molecular Probes in Living Cells. Current Organic Chemistry [online]. 2013, 17 (6): 564–579 [cit. 2015–09–10]. DOI: 10.2174/1385272811317060003.
39. BAUMGARTH N, ROEDERER M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. J Immunol Methods. 2000 Sep 21;243(1-2):77-97. doi: 10.1016/s0022-1759(00)00229-5. PMID: 10986408.
40. JUAN FLORES-MONTERO, TOMAS KALINA, ALBA CORRAL-MATEOS, LUZALBA SANOJA-FLORES, MARTIN PÉREZ-ANDRÉS, MARTA MARTIN-AYUSO, LUKASZ SEDEK, KATERINA REJLOVA, ANDREA MAYADO, PAULA FERNÁNDEZ, VINCENT VAN DER VELDEN, SEBASTIAN BOTTCHER, JAQUES J.M. VAN DONGEN, ALBERTO ORFAO, Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry, Journal of Immunological Methods, Volume 475, 2019, 112618, ISSN 0022-1759
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.06.009>
41. LEDVINA, MIROSLAV, et al. Biochemie pro studující medicíny I. díl. 2. vydání. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. 269 s.
42. LENG X-H, HONG SY, LARRUCEA S ET AL (2004) Platelets of female mice are intrinsically more sensitive to agonists than are platelets of males. Arterioscler Thromb Vasc Biol J Am Hear Assoc 24:376–381
43. SABETTA, A., LOMBARDI, L. & STEFANINI, L. Sex differences at the platelet–vascular interface. *Intern Emerg Med* 17, 1267–1276 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11739-022-02994-y>
44. CARAZO, ALEJANDRO, MARCEL HRUBŠA, LUKÁŠ KONEČNÝ, CATHERINE GUNASEELAN, JAKA FADRAERSADA, PAVEL SKOŘEPA, MARKÉTA PACLÍKOVÁ, et al. 2024. “Correlations among Different Platelet Aggregation Pathways in a Group of Healthy Volunteers.” *Platelets* 35 (1). <https://doi.org/10.1080/09537104.2024.2336093>

45. SANTILLI F, VAZZANA N, LIANI R, GUAGNANO MT, DAVÌ G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2012 Jan;13(1):27-42.
doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00930.x. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21917110.

Obrázky:

Obr. 12

Histogram-plot

https://is.muni.cz/el/med/podzim2020/MBKB071p/um/Prutokova_cytometrie.pdf?lang=en

Contour-plot

<https://www.abcam.com/content/data-analysis-in-flow-cytometry>