Univerzita Pardubice

Chemicko-technologická fakulta

Bakalářská práce

Tromboembolická nemoc u interních a onkologických pacientů

Lucie Janků

© 2022-2023 VŠCHT v Pardubicích

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Lucie Janků**
Osobní číslo:	**C18232**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Tromboembolická nemoc u interních a onkologických pacientů**
Téma práce anglicky:	**The Venous Thromboembolism in Internal and Oncological Patients**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1) Na základě odborné literatury uspořádejte aktuální informace o tromboembolické nemoci.

2) Blíže se zaměřte na tromboembolickou nemoc u interních a onkologických pacientů.

3) Věnujte pozornost také metodice stanovení jednotlivých laboratorních parametrů spojených s tromboembolickou nemocí v lidském biologickém materiálu, včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Příloha č. 1: **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

Práci s názvem Tromboembolická nemoc u interních a onkologických pacientů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27.6.2023

Lucie Janků

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou děkuji Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce na téma Tromboembolická nemoc u interních a onkologických pacientů, za trpělivost, příjemnou spolupráci a ochotu. Děkuji také své rodině a blízkým za podporu během celého studia.

Název: Tromboembolická nemoc u interních a onkologických pacientů

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na tromboembolie u interních a onkologických pacientů, dále také na metody používané při hledání potenciálních biomarkerů, a i některá rutinní vyšetření.

V první části se tato práce zabývá aktuálními informacemi o tromboembolické nemoci. V další části této práce je uvedeno, jak tromboembolická nemoc vzniká u interních pacientů a blíže je zaměřena na onkologické pacienty. Třetí část je zaměřena na laboratorní vyšetření parametrů spojených tromboembolickou nemocí v lidském biologickém materiálu, včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Klíčová slova: tromboembolická nemoc, interní pacienti, onkologičtí pacienti, nádorové buňky, krevní destičky, podoplanin, Neutrofilní extracelulární pasti, mikrovezikuly

Title: The venous thromboembolism in internal and oncological patients

ANNOTATION

This bachelor thesis is focusing on thromboembolism in internal and oncology patients, as well as methods used in the search for potential biomarkers and some routine tests.

The first part of this thesis deals with the current information on thromboembolic disease. The next part of this thesis discusses how thromboembolic disease arises in internal medicine patients and focuses more closely on cancer patients. The third part focuses on the laboratory investigation of parameters associated with thromboembolic disease in human biological material, including conditions for sample collection, transport and storage.

Keywords: thromboembolic disease, internal patients, cancer patients, cancer cells, platelets, podoplanin, Neutrophil extracellular traps, microvesicles

Obsah

1 Úvod 10

2 Tromboembolie 11

2.1 Pojem tromboembolie 11

2.2 Historie tromboembolie 11

2.3 Trombus (krevní sraženina v cévě u živého člověka) 15

2.4 Aterotrombóza 16

2.5 Trombocyty (krevní destičky) 18

2.6 Koagulační kaskáda 20

2.6.1 Význam jater pro koagulační kaskádu 21

2.7 Žilní tromboembolická nemoc 22

2.7.1 Trombofílie 22

2.7.2 Plicní embolie 23

2.7.3 Hluboká žilní trombóza 23

2.7.4 Vrozené rizikové faktory TEN 24

2.7.5 Získané rizikové faktory 24

2.7.6 Vlivy prostředí 25

3 Riziko TEN u interních pacientů 25

3.1 Akutní interní onemocnění 25

3.1.1 Imobilizační syndrom 26

3.1.2 Flebotrombóza a tromboflebitida 26

4 Souvislost nádorového onemocnění se vznikem tromboembolie 27

4.1 Mechanismy vniku nádorové trombózy 27

4.1.1 Prokoagulační proteiny a heparanáza 28

4.1.2 Podoplanin a CLEC-2 28

4.1.3 Aktivace KD 31

4.2 Interakce KD a nádorových buněk 32

4.2.1 Nádorové supresory 34

4.2.2 Příklad interakce nádorových buněk s KD v hepatocytech 35

4.3 NET 37

4.4 Mikrovezikuly 41

4.5 Fibrinolýza 43

5 Vyšetření pacienta 43

5.1.1 Anamnéza 44

5.1.2 Pomocná vyšetření pacientů s PE 44

5.2 Laboratorní vyšetření 46

5.2.1 Rutinní laboratorní vyšetření 46

5.2.2 Výzkum potenciálních biomarkerů 54

6 Závěr 58

Obsah obrázků

Obrázek 1 Primární hemostáza……16
Obrázek 2 *Aterosklerotické pláty:*.....18
Obrázek 3 *Koagulační kaskáda a působení koagulačních faktorů při tvorbě trombu:* 20
Obrázek 4 *CLEC-2 a podoplanin*.....29
Obrázek 5 *Koagulace a aktivace KD podporující nádorové metastázy*……...33
Obrázek 6 *Cirkulující nádorové buňky (CTC):* 34
Obrázek 7 *Putování nádorové buňky v játrech:*.....36
Obrázek 8 *Přichycení nádorové embolie k jaterní buňce:* 37
Obrázek 9 *PS buňky, mikročástice a NET podporují hyperkoagulabilitu a žilní trombózu v souvislosti s cirkulujícíma krevníma buňkama:* 38
Obrázek 10 *Působení NET na ECS:*.....38
Obrázek 11 *Nádorové buňky a tvorba NET:* 40
Obrázek 12 *Prohemostatické interakce mezi rozpustnými faktory/EVs odvozenými z nádorových buněk a KD* 41
Obrázek 13 *Prohemostatické interakce mezi rozpustnými faktory/EV odvozenými z nádorových buněk a neutrofily*.....42
Obrázek 14 *Možné propojení navrhovaných mechanismů EV odvozených z nádoru při trombóze spojené s nádorovým onemocněním:* 43
Obrázek 15 *Multimerizace VWF elektroforézou :* 55

Seznam zkratek:

Akt - proteinkináza B

APTT- Aktivovaný parciální tromboplastinový čas

cfDNA - bezbuněčná DNA

CLEC-2 - C-typ lektin-like receptor 2

CRP - C reaktivní protein

CTC - cirkulující nádorový buňky

DIC- Diseminovaná intravaskulární koagulace

DVT – hluboká žilní trombóza

ERM - protein ezrin/radixin/moesin

EVs, EV – extracelulární váčky

IL-β - interleukin-beta

INR- mezinárodní normalizovaný poměr

ISI - mezinárodní index citlivosti

KD- krevní destičky

kRAS a MET – onkogeny

MAPK - mitogenem aktivovaná proteinkináza

MPs – Mikročástice

NET - extracelulární neutrofilní pasti

NF-κB - jaderný faktor-kappa B

NKG2 - NK aktivujících imunitní receptor

NQO1 - NAD(P)H chinonoxidoreduktáza 1

CP - rakovinový prokoagulant

PCR - polymerázová řetězová reakce

PE – plicní embolie

PDGF - destičkový růstový faktor

PLAG - platelet aggregation-stimulating

PLD - PLAG-like domain

PIP2 - fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát

PIP3 - fosfatidylinositolu 1,4,5-trisfosfátu

PI3K - fosfatidylinositol 3-kinázy

PolyP - polyfosfáty

PS – fosfatidylserin

PSGL1 - P-selektinový glykoprotein ligand 1

p53 a PTEN - nádorový supresory

PT - Stanovení protrombinového času

ROS- reaktivní druhy kyslíku

SIRT - sirtuin

SYK - slezinná tyrosinkináza

TEN – tromboembolie – vmetení trombu

TGFβ - transformující růstový faktor beta

TF – tkáňový faktor

TNF-α - tumor nekrotizujícího faktoru α

TT- Trombinový čas

VEGF - vaskulární endoteliální růstový

VTE – žilní tromboembolická nemoc

VWF- von Willebrandův faktor

1 Úvod

Nejčastějším úkazem tromboembolie je žilní tromboembolismus, který je celosvětově hlavní příčinou úmrtí a invalidity u lidí. Výskyt žilního tromboembolismu je vyšší u žen než u mužů a zvýšený u pacientů s nádory ve srovnání s pacienty bez nich. Předložená bakalářská práce se blíže zaměřila na tyto pacienty s nádory. Druhým zaměřením práce jsou interní pacienti, kde dochází také k tvorbě tromboembolie při různých stavech spojených se zánětem.

Spojitost nádorů s tromboembóliemi je velice důležitý fakt, protože nádorové buňky prostřednictvím svých faktorů mohou přímo aktivovat systém krevního srážení a další funkce, a tak zasahovat do koagulace, narušovat funkci a integritu cévního endotelu vedoucí k její aktivaci anebo nádorem omezit průtok cévou. Nádorové buňky velice dobře spolupracují s krevními destičkami, se kterými se na sebe vážou pomocí integrinů. Jsou schopny vytvářet prokoagulační proteiny, mikročástice a také zánětlivé cytokiny, které podporují vznik trombu.

Nádorové buňky používají krevní destičky jako ochranu vytvořením mikroembolie. Ta jim umožní únik před imunitním systémem a náročným mikroprostředím. Díky tomu mohou přežívat a tvořit metastázy. Dalším podnětem k tvorbě trombu ať s nádorovými buňkami nebo bez nich jsou tvorby extracelulárních neutrofilních pastí z neutrofilů při zánětech. Nádorové buňky neovlivňují pouze stavy koagulace, ale také mohou ovlivnit fibrinolýzu. Působí na proteiny fibrinolýzy, kde následně například dochází ke vzniku D-dimerů, které měříme.

Cílem mé práce je se zaměřit na tromboembolickou nemoc u interních a onkologických pacientů. Jak se stanovují jednotlivé laboratorní parametry spojené s touto nemocí v lidském biologickém materiálu, popřípadě které biomarkery by byly vhodné prozkoumat pro lepší diagnostiku a sledování onemocnění.

Důvodem pro výběr tohoto tématu je, že se o něm ví v široké populaci málo, ikdyž díky onemocnění COVID-19 se situace zlepšuje. Pro boj s touto nemocí vznikla například organizace s názvem AQUAPURA, která je nadačním fondem, který nemocným jedincům chce pomoci a poskytuje jim i přístroje pro domácí použití. U nás v ČR je těchto přístrojů málo a v nemocnicích nejsou součástí běžné výbavy, a proto se na každého jednice nedostane. Tento přístroj je, tzv. systém POINT OF CARE a vyhodnocuje výsledky za pouhé 2 minuty.

2 Tromboembolie

2.1 Pojem tromboembolie

Název tromboembolie (TEN) vznikl ze dvou po sobě jdoucích stavů. První z nich je trombóza, je to vývoj a usazování krevní sraženiny nebo-li trombu. Ta se usadí v cévě a tím v ní sníží průtok krve. Druhý stav je embolie. Ta nastává, když se kousek tohoto trombu odloučí nebo když se cizí předmět či jiná tělesná látka, jako je např. tuková částice či vzduchová bublina, vytvoří na nějakém místě a cestuje přes oběhový systém, dokud neuvízne v cévě, do které se nevejde, a tím do značné míry znemožní průtok krve nebo jej úplně zastaví. Díky tomu buňky nemají dostatek kyslíku a začnou odumírat. TEN je jedním z nejčastějších druhů embolie. **(**Ashorobi D. et al., 2022)

2.2 Historie tromboembolie

Hluboká žilní trombóza (DVT) je celkem časté onemocnění, je však v dějinách medicíny popsána teprve „nedávno“. Na rozdíl od křečových žil, které jsou v umění a literatuře zobrazovány již od starověku. Ani slavný řecký lékař Hippokrates nebo římští lékaři, jako byli Galén nebo Caelius Aurelianus, nezaznamenali případ naznačující diagnózu DVT, to platí i pro umění starého Egypta, Persie a Jižní Ameriky. (J.P. Galanaud et al., 2013)

Jediný člověk, který varoval před rizikem "migrace částic" v případech žilních operací, což odpovídá embolizaci a DVT, byl orientální vědec Avicenna (980-1037), ale neposkytl žádný formální popis. (J.P. Galanaud et al., 2013)

První dobře zdokumentovaný případ žilní trombózy je vyobrazen v krásně ilustrovaném rukopise napsaném ve 13. století. V tomto rukopise je františkánským mnichem Guillaume de Saint Pathusem popsán případ mladého ševce z Normandie jménem Raoul, kterému bylo 20 let. Objevil u něj jednostrannou bolest a otok pravého lýtka, které se následně rozšířily až na stehno bez dalších zjevných příznaků. V průběhu nemoci mu noha začala hnisat a objevily se vředy. Šel k velmi uznávanému chirurgovi Henrimu du Perchemu, který mu doporučil, aby počkal a pak se uvidí. Stále se mu to zhoršovalo, až měl projevy gangrény. Poté Raulovi bylo doporučeno navštívit hrob svatého Ludvíka, který byl pohřben v kostele sv. Denise. Raul zde strávil několik dní zpovídáním se ze svých hříchů a modlil se ke světci. Poté se rozhodl posbírat prach hromadící se pod kamenem, jenž zakrýval hrobku, a aplikoval si ho na ránu a vředy na nohou. Nejprve byl nucen používat berle, ale následně mohl chodit i bez pomůcek, i když mu noha trochu pulzovala. Raul byl tímto způsobem vyléčen v roce 1271 a v roce 1282 byl stále živý a zdravý. Nejenže se jedná o první popsaný

případ žilní trombózy, ale i nízký věk pacienta nás vede k podezření, že Raul trpěl trombofilním onemocněním. (P.M. Mannucci, 2002)

Nejčastější a nejoblíbenější metodou mezi lékaři v 17. století bylo samozřejmě pouštění žilou, jak je zvěčněno v Moliérově divadelní hře "Imaginární invalida (1673)". Tato technika se používala k léčbě DVT a mnoha dalších onemocnění až do konce 19. století. (J.P. Galanaud et al., 2013)

Podobný popis první poporodní žilní trombózy byl proveden v Anglii v roce 1676 Richardem Wisemanem, seržantem-chirurgem krále Karla II. Psal o manželce lékárníka, u níž se po těžkém porodu objevil otok a bolest pravé nohy, který se táhl od kolene ke kyčli bez zánětu a změny barvy kůže. Wisemanův popis tohoto případu je pozoruhodný nejen tím, že se v něm ukazuje koncept proximálního šíření žilního trombu v noze, ale také proto, že Wiseman předpokládal, že tvorba trombu je způsobena systémovou změnou cirkulující krve, čímž se stal průkopníkem objevu trombu. V cévách nastával reflux krve. Tehdy si s porodem spojovali tuto nemoc. (P.M. Mannucci, 2002)

V roce 1784 skotský chirurg John Hunter prokázal souvislost mezi DVT a plicní embolií (PE) díky tomu, že prováděl podvazy žil nad trombózami, aby zabránil rozšíření trombů. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo najít žádnou jinou účinnější léčbu pro prevenci smrtelné PE, tak se tato technika na konci 19. století začala používat stále více. Tato chirurgická léčba byla až do poloviny 20. století hojně využívána ve spojení s antikoagulancii nebo místo nich. Z obavy před migrací trombu byl předepisován přísný klid na lůžku, který byl přinejmenším od konce 19. století základem léčby DVT. (J.P. Galanaud et al., 2013)

V roce 1865 francouzský lékař Armand Trousseau zkoumal nemoc, kterou sám trpěl, a nakonec na ni i zemřel. Syndrom je po něm dnes pojmenovaný Trousseauův. Měl druh žilní trombózy, která se nazývá migrační povrchová tromboflebitida (viz 3.1.2). Syndrom popisuje souvislost mezi rakovinou a trombózou. Trousseau měl tromboflebitidu horní končetiny ve spojení s viscerálním karcinomem. (J. Rogers, 2020, S. Ikushima et al., 2016)

V roce 1856 německý patolog Rudolf Virchow, na základě patologických pozorování provedených především u fatálních případů poporodní trombózy, navrhl slavnou triádu faktorů, které jsou dodnes považovány za hlavní faktory v patogenezi žilní trombózy. Jsou to žilní stáza, při níž se hromadí koagulační faktory a zpomalí se tok krve, poranění endotelové stěny cév a hyperkoagulační stav. (P.M. Mannucci, 2002)

Před 30. lety 20. století, před zavedením antikoagulancií, se nejčastější léčba DVT opírala hlavně o klid na lůžku, o fixaci trombu na místě, elevaci postižené končetiny tak, aby

se podpořil žilní návrat, aplikaci tepla s teplými obklady ke snížení vazospazmů a ke zvýšení kolaterálního oběhu. (J.P. Galanaud et al., 2013)

Důležitým objevem se stal heparin, což je látka s protisrážlivými účinky. Objevitel heparinu byl v roce 1916 student druhého ročníku medicíny Jay McLean, který pracoval na katedře fyziologie Lékařské fakulty Johns Hopkins v Baltimoru pod vedením významného vědce Williama Howella. Délka léčby heparinem se v jednotlivých centrech lišila, ale obvykle byla 7-10 dní. Zavedení perorálních antagonistů vitaminu K, důležitého pro krevní srážení, pro tuto indikaci v roce 1941 umožnilo léčbu prodloužit. (A D. Da Gama, 2008, J.P. Galanaud et al., 2013)

Na antagonisty vitamínu K se přišlo v prériích Severní Dakoty a Alberty na počátku 20. století. Záhadné hemoragické onemocnění zdecimovalo dobytek v této oblasti a zruinovalo řadu farmářů. Zjistilo se, že onemocnění způsobuje zkažený sladký jetel. V roce 1939 Karl Link a jeho spolupracovníci poskytli důkaz, že kumarin, nepatogenní látka, se v plesnivém jeteli oxiduje na dikumarol, a prokázali, že účinky dikumarolů a zkaženého jetele lze zvrátit vitaminem K. O dva roky později byl dikumarol poprvé použit při léčbě DVT. Link se rozhodl otestovat protisrážlivost všech kumarinů, které byly syntetizovány v jeho laboratoři v letech 1940-1944, aby vyvinul optimální rodenticid. Zde začal příběh warfarinu, který byl původně uveden na trh v roce 1948 jako ideální jed na krysy a byl považován za příliš toxický pro použití u lidí. Neúspěšný pokus o sebevraždu příslušníka námořnictva s 567 mg warfarinu (vstřebaného za 5 dní) však ukázal, že tato molekula není tak toxická. Heparin je parenterální a okamžitě účinný, zatímco antagonisté vit. K se užívají perorálně, což umožňuje dlouhodobou léčbu. (J.P. Galanaud et al., 2013)

Chirurg William D. Byrne v roce 1955 zkoumal až 748 případů a prokázal, že pooperační stavy jsou druhou nejčastější příčinou vzniku žilní trombózy. První příčinou bylo již zmíněné těhotenství. Týkalo se to především operací rakoviny, pánve a zlomenin nohou. Tato onemocnění, zejména pokud jsou pacienti dlouhodoběji upoutáni na lůžku, jsou rizikovými faktory pro žilní onemocnění trombózy. (P.M. Mannucci, 2002)

V roce 1965 se objevila existence genetických faktorů zvyšujících riziko vzniku žilní nemoci. Objev nastal díky norské rodině, která měla už v mladém věku tendence ke snížení antitrombinu na polovinu normálních hodnot. Toto zjištění se okamžitě ukázalo jako biologicky věrohodné, protože antitrombin je přirozeně se vyskytující antikoagulační protein, který inaktivuje hlavní koagulační faktory (trombin, aktivované faktory X, IX a XI). Deficit antitrombinu však vysvětluje pouze malou část případů žilní trombózy, která se vyskytuje jen u několika málo případů. (P.M. Mannucci, 2002)

V roce 1973 dvě výzkumné skupiny souběžně oznámily nález unikátního fragmentu vzniklého z lidského a hovězího fibrinu, jež je vláknitý protein vznikající v závěrečné fázi srážení krve a je rozložitelný hydrolytickým působením plazminu (fibrinolýza). Následně tento fragment dostal poněkud mylný název D-dimer. Tento D-dimer byl fragment ze zkřížených fibrinových zbytků a obsahoval dvě domény D ze sousedních molekul fibrinu. Tito vědci předpověděli, že "detekce a stanovení D-dimeru by mohly být v budoucnosti důkazem, jak užitečný diagnostický nástroj to je". Název D-dimer se vžil až o 20 let později, kdy pomocí kontrolované lýzy vědci vytvořili rozpustné jedno-doménové agregáty o molekulové hmotnosti cca $2x10^6$. (P.J. Gaffney, 1993)

Další krok kupředu byl učiněn na počátku 80. let 20. století, kdy se podařilo americké skupině badatelů vedené Johnem Griffinem a Charlesem Esmonem zjistit, že nedostatek proteinu C a S jsou dědičnými rizikovými faktory pro onemocnění žilní trombózy. Aktivní enzymatická forma proteinu C se svým kofaktorem proteinem S inaktivuje aktivovanou formu koagulačních faktorů V a VIII. (P.M. Mannucci, 2002)

V roce 1994 byla objevena Leidenská mutace, tedy mutace v genu kódujícím koagulační faktor V, objevitel byl Björn Dalhbäck v Nizozemském městě Leiden. V tomto roce vedl tým v Leidenu Rogier Bertina a díky tomuto objevu se následně našly i další mutace, jako je mutace faktoru II neboli protrombinu. (P.M. Mannucci, 2002)

Nejvýznamnějším krokem ke zjednodušení antikoagulační léčby byl vývoj nefrakciovaného heparinu, který ve většině případů nevyžaduje monitorování. Tyto molekuly byly v Evropě zavedeny na počátku 80. let a jejich používání se rozšířilo během deseti let. V roce 1996 Levine prokázal, že nefrakciovaný heparin podávaný doma je k léčbě proximální DVT stejně bezpečný a účinný jako při podávaní v nemocnici. Dnes se používá i nízkomolekulární heparin neboli frakciovaný heparin, který vznikl z tohoto nefrakciovaného. Ten je bezpečnější a o něco účinnější. Inhibuje přímo aktivovaný plazmatický faktor X oproti nefrakciovanému, který inhibuje až trombin. Díky menší velikosti nízkomolekulárního heparinu má působení delší trvání a pevnější vazbu, oproti nefrakciovanému, kde účinnost rychle vyprchá. (J.P. Galanaud et al., 2013, J. Bauer, 2010)

Ve stejném roce Partschova malá randomizovaná studie poskytla důkaz, že ve srovnání s dlouhodobým klidem na lůžku, časná chůze s používáním kompresivních punčoch zlepšila bolesti a působila proti otokům, aniž by zvyšovala riziko PE. Po tomto zjištění se kompresivní punčochy začaly více využívat v ambulantních zařízeních a stalo se to standardem, a dokonce i doporučenou léčbou. (J.P. Galanaud et al., 2013)

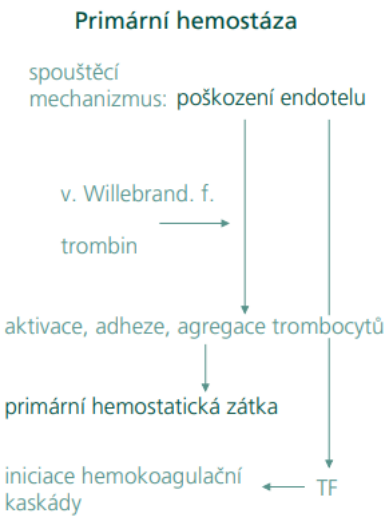
ETrombóza je nový název pro žilní tromboembolismus ve 21. století, spojený s imobilitou z dlouhodobého sezení. Vzhledem k rozšířenému používání počítačů ve vztahu k práci, odpočinku a osobní komunikaci může být potenciální zátěž eTrombózy značná. Poměrně zásadní průlomy v objevech TEN byly učiněny během posledních 100 let. (R. Beasley et al., 2003, J.P. Galanaud et al., 2013)

2.3 Trombus (krevní sraženina v cévě u živého člověka)

V těle je nepřetržitý průtok krve tepnami, kapilárami a žilami. Mezi krví a endotelem těchto cév je vzájemná interakce. Tím, že krev protéká, působí zároveň proti vzniku trombózy. Cévní stěna má 3 vrstvy tunica intima (vnitřní), media a externa (vnější). Cévní endotel vytváří fyzickou bariéru mezi krví a subendoteliálním kolagenem. Díky tomu nedochází ke vzniku trombu při nepoškozeném endotelu. (W. E Winter et al., 2017)

Když se řekne slovo krevní sraženina, tak si téměř každý představí trombus, ale zároveň je v těchto pojmech malý rozdíl. Krevní sraženina vzniká v krevních cévách v posmrtném stavu, anebo když je krev odstraněna z těla a není antikoagulována. Trombus je naopak koagulant, který vznikl v cévě živého člověka. (W. E Winter et al., 2017)

Trombus se obvykle vytváří jako normální fyziologická reakce při hemostáze neboli zástavě krvácení. Hemostáza zahrnuje 4 po sobě jdoucí děje (Obrázek 1). Prvním z nich je reakce cév vazokonstrikcí na poškození endotelu, kde postupně dochází ve spolupráci s von Willebrandovým faktorem (VWF) a trombinem k adhezi, aktivaci a agregaci krevních destiček (KD). VWF vyprodukovaný endoteliálními buňkami těla se po poranění endotelu váže na subendoteliální kolagen a také se spojuje s receptory KD a zároveň je aktivuje. Po aktivaci KD změní tvar, rozšíří se a vznikají pseudopodia (výběžky), aby se KD mohly vzájemně napojit na sebe a shluknout se (agregace). Díky jejich přestavbě vylučují svůj obsah granulí, uvolňují ADP a syntetizuje se a uvolňuje tromboxan A2. Po této přeměně KD už umožňují vázat plazmatický fibrinogen. Po agregaci se vytváří labilní primární hemostatická zátka, která poté reaguje s fibrinem, který vznikl při další fázi hemostázy. Zároveň se z poškozeného endotelu uvolňuje tkáňový faktor (TF), kterým začíná hemokoagulace a posledním dějem je fibrinolýza (viz 4.5). Cílem hemokoagulace je postupně aktivovat koagulační faktory, což jsou rozpustné plazmatické bílkoviny, a také přeměna rozpustného fibrinogenu pomocí trombinu na nerozpustný fibrin a vytvořit poté trombus. (viz obrázek 3) (J. Arnout et al., 2006, W. E Winter et al., 2017, C. Jerjes-Sanchez, 2005, J. Bauer, 2010)



Obrázek 1 *Primární hemostáza (převzato a upraveno dle J. Bauera, 2010)*

Žilní trombóza je tradičně spojována s „červenou sraženinou“ bohatou na červené krvinky a fibrin, zatímco arteriální tromby vzniklé na aterosklerotických lézích s aktivním zánětem jsou bohaté na KD, což dává vzhled „bílé sraženiny“. Nicméně různé studie naznačují, že zánět a aktivace KD se také účastní žilní trombogeneze. V některých klinických situacích bylo pozorováno koronární a plicní vaskulární uvolňování interleukinů 6 a 8 (IL-6 a -8). Takové zvýšení hladin cytokinů a chemokinů může vést ke shlukování a aktivaci leukocytů na vaskulární stěně, což urychluje lokalizovanou tvorbu trombinu a fibrinu. Při analýze žilních trombů se odhalují zamotaná bledá vlákna agregovaných KD a fibrinu v mase červených krvinek. Při tvorbě žilního trombu se KD akumulují v „hlavě“ trombu. Poté se ukládání KD do trombu zpomalí a stanou se „červenými“, ty jsou převážně složeny z fibrinu a erytrocytů. (C. Jerjes-Sanchez, 2005)

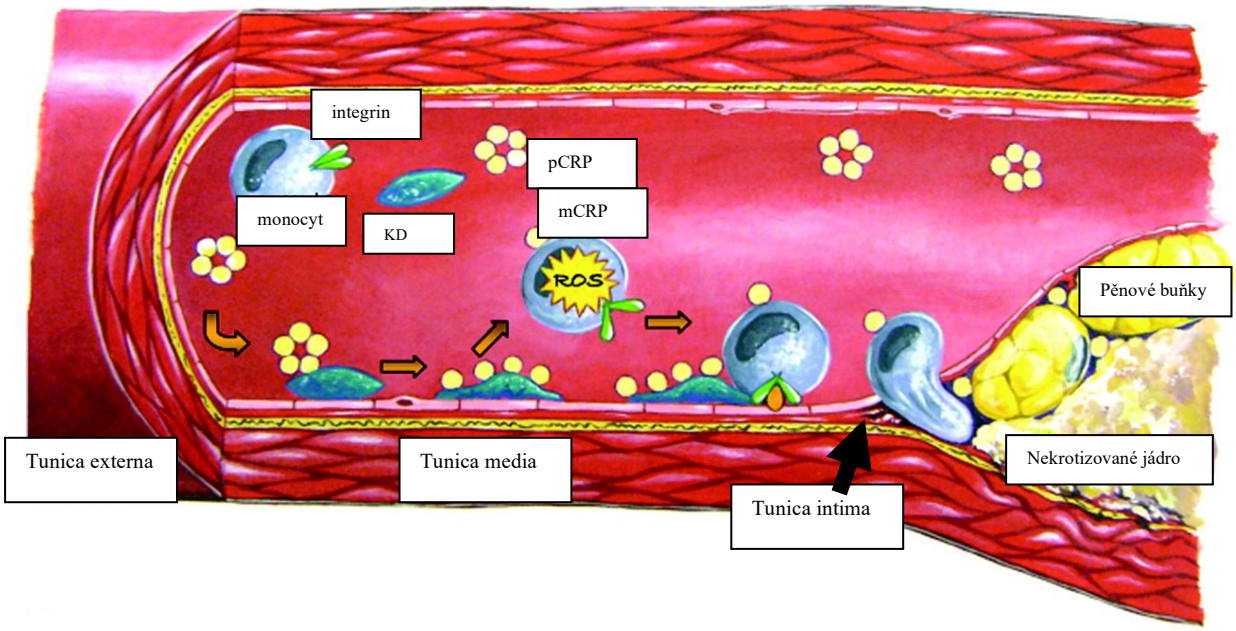
2.4 Aterotrombóza

Aterotrombóza je komplexní zánětlivý patologický proces zahájený aterosklerózou, tedy akumulací lipidových plaků v arteriální stěně. Plak se skládá z cholesterolu, z lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), vápníku a dalších látek v krvi. Ateroskleróza umožňuje aktivaci KD, což způsobuje jejich adhezi a agregaci, jež vedou ke vzniku trombu. (Ashorobi D. et al., 2022, L. Badimon et al., 2018)

Během vývoje aterosklerózy následně probíhá nábor cirkulujících leukocytů. Primární prozánětlivé cytokiny, jako je IL-1 a tumor nekrotizující faktor α (TNF-α), potencují expresi adhezních molekul na vaskulárních endoteliálních buňkách, což vede k náboru leukocytů do arteriální stěny v časných stádiích vývoje ateromatózních lézí. Primární cytokiny také aktivují chemokiny, které podporují následnou migraci monocytů do subendoteliálního prostoru. Mononukleární buňky s vnitřními vaskulárními buňkami následně uvolňují růstové

faktory, které stimulují proliferaci buněk hladkého svalstva a vedou k progresi plaku. Počáteční lipidové plaky se vyvíjejí a stávají se z nich vláknité plaky, po nějakém čase plak ztvrdne a zúží tepny, a tak omezí průtok krve. Plaky by mohly prasknout a eroze povrchů některých z nich by mohla vést k uvolnění dalších prokoagulačních faktorů. Primární prozánětlivé cytokiny také stimulují expresi mediátorových cytokinů, jako je IL-6. Jiné prozánětlivé mediátory, jako je ligand CD40L, při vazbě na receptory, jako je CD40, indukují expresi TF a tím podporují tvorbu trombu. Zánět hraje stěžejní roli ve všech fázích a C-reaktivní protein (CRP) se aktivně účastní spousty procesů, které přispívají k aterotrombóze. (Ashorobi D. et al., 2022, S.S. Bassuk et al., 2004, L. Badimon et al., 2018)

Pentamerní C-reaktivní protein není detekovatelný ve zdravých ani v aterosklerotických cévách, zatímco monomerní CRP je detekovatelný ve stěně cévy v raných stádiích aterogeneze, ale ne ve zdravých cévách, hromadí se během progrese aterosklerózy a je schopen vyvolat lokální zánětlivé reakce (Obrázek 2). Cirkulující pentamerní CRP se váže na buněčnou membránu aktivovaných monocytů a přispívá k nestabilitě plaku a jejich náboru do plaku tím, že indukuje jejich polarizaci. Může podporovat zánět i vazbou na enzymaticky modifikované nebo oxidované LDL, čímž se transformují makrofágy na pěnové buňky. Aktivované KD a apoptické lekocyty jsou schopny disociovat pentamerní C-reaktivní protein na monomerní CRP prostřednictvím lyzofosfatidylcholinu, indukujícího produkci reaktivní druhy kyslíku (ROS). ROS následně mění strukturu a rozpoznávací funkci CRP a následuje chemotaxe leukocytů, které poté transmigrují na endotel a adherují. Monomerní CRP indukuje sekreci IL-8 v neutrofilech a tím podporuje adhezi neutrofil-endoteliální buňky a zpomaluje apoptózu lidských neutrofilů. (L. Badimon et al., 2018)



Obrázek 2 *Aterosklerotické pláty: Cirkulující KD ulpívají na zaníceném nebo poraněném endotelu (znázorněno růžově) a silně se aktivují. Cirkulující pCRP (pentamerní CRP) se váže na fosfocholin na aktivovaných KD a disociuje se na mCRP (monomerní CRP) prostřednictvím lyzofosfatidylcholinu. mCRP pak stimuluje cirkulující monocyty, aktivuje integrinové receptory (znázorněno zeleně) a vede k adhezi monocytů k receptorům na endoteliálních buňkách (znázorněno oranžově), produkci ROS a transmigraci monocytů do intimy a tvorbě pěnových buněk. mCRP se pak ukládá do aterosklerotického plátu. (převzato a upraveno dle S.U. Eisenhardta et al., 2009)*

Za fyziologických podmínek endotel zprostředkovává vaskulární vazodilataci, také produkuje prostacyklin, který inhibuje KD, tím zabraňuje jejich adhezi a aktivaci a zároveň je antagonista tromboxanu A2. Na endoteliálním povrchu je také exprimován heparansulfát, který aktivuje antitrombin, aby narušil tvorbu trombu, v tomto procesu dojde k narušení trombinu a FX, FIX a FXI. Endotel i zmírňuje ukládání fibrinu několika cestami. Adheze a transmigrace zánětlivých leukocytů na endotel jsou oslabeny a kyslíkové radikály jsou účinně vychytávány. (W. E Winter et al., 2017, C. Jerjes-Sanchez, 2005)

2.5 Trombocyty (krevní destičky)

KD jsou fragmenty z magakaryocytů kostní dřeně a uvolňují se do krevního řečiště. V bazálním stavu cirkulují, aniž by vytvářely adheze s endotelem. Membrána KD se skládá z fosfolipidů, mnoha receptorů a glykoproteinů, které umožňují jejich rychlou adhezi, aktivaci a agregaci. (L. Plantureux et al., 2018, V.H. Almeida et al., 2019)

Nedávno se začalo používat slovo „imunotrombóza“ a říká, že za určitých okolností je trombóza „fyziologickým procesem“, kde KD souvisí i s vrozenou imunitou a nemají funkci jen v hemostáze. Účastní se dějů s neutrofily, monocyty a dendritickými buňkami, které vedou k nemocem souvisejícím s trombózou. (Hiroyasu I. et al., 2022)

KD obsahují 3 druhy granul: denzní granula, alfa granula a lysozomální granula. Všechny druhy granul se nachází v cytoplazmě. Dospělá alfa granula uvolňují exocytózou svůj obsah po stimulaci KD procesem zahrnujícím „dynamin-related protein- 1“. Tato granula uvolňují protrombin, fibrinogen, faktror V, VIII, XIII (fibrin stabilizující faktor), které podporují a stimulují tvorbu koagulace a fibrinu. Také obsahují růstové proteiny, jako jsou destičkový růstový faktor (PDGF), základní fibroblastinový růstový faktor, transformující růstový faktor beta (TGFβ), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) atd. které se také uvolňují v místech adheze cirkulujících nádorových buněk (CTC) na endotelu. Obsahují integrin αIIbß3, kterým se přichytávají. Dále uvolňují faktory jako je alfa2-makroglobulin, aktivátor plazminogenu, plazminogen, inhibitor aktivátoru plazminogenu, které pomáhají při fibrinolýze při rozpouštění trombu, opravách ran a ústupu zánětu. Protizánětlivé mediátory přitahují imunitní buňky, aby sterilizovaly ránu. (D. Flaherty, 2012, Preeti Kanika M. et al., 2021, A. Mitrugno et al., 2016, D.R. Edwards et al., 2008)

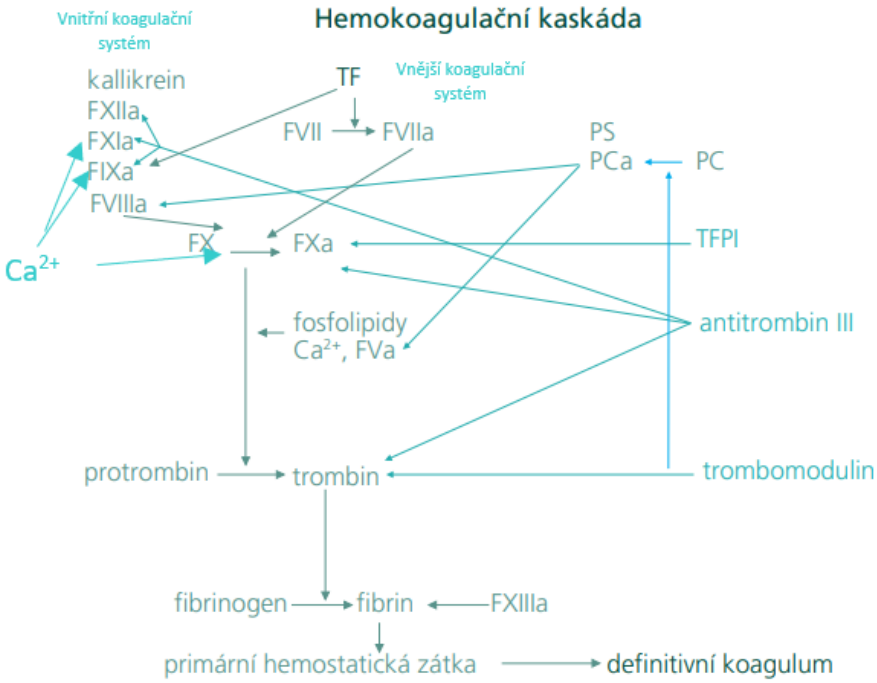
Granula uvolňují také enzymy, které se podílejí na opravě tkáně, jako jsou metaloproteinázy, tkáňové inhibitory metaloproteináz a také dezintegrinové metaloproteinázy. Metaloproteinázy přispívají k přestavbě tkání a stimulují transmigraci nádorových buněk a jejich invazi do okolních tkání. Dezintegrinové metaloproteinázy jsou fascinující rodinou transmembránových a secernovaných proteinů s důležitou rolí v regulaci buněčného fenotypu prostřednictvím svých účinků na buněčnou adhezi, migraci, proteolýzu a signalizaci. Funkční dezintegrinové metaloproteinázy se podílejí na „uvolňování ektodomény“ různých růstových faktorů, cytokinů, receptorů a adhezních molekul. Po uvolnění z alfa granulí rozkládají specifické složky extracelulární matrice, tím zvýší permeabilitu a extravazaci CTC a také uvolní růstové faktory v extracelulární matrici. (D. Flaherty, 2012, Preeti Kanika M. et al., 2021, A. Mitrugno et al., 2016, D.R. Edwards et al., 2008)

Denzní granula aktivně akumulují a sekvestrují nukleotidy ATP, GTP, ADP, GDP a cyklické nukleotidy. Např. ADP podporuje agregaci KD. Tato granula uvolňují vysílače jako serotonin, adrenalin a histamin, které ovlivňují cévní funkce, makrofágy, trombózu, regeneraci jater a progresi rakoviny. Také v sobě ukrývají Ca^{2+}. Lysozomální granula obsahují proteázy a glykosidázy, jako je kolagenáza a katepsin. (Preeti Kanika M. et al., 2021, L. Plantureux et al., 2018)

KD obsahují bohatý repertoár druhů RNA, včetně messengerové RNA, ribozomální RNA, mikro RNA, malé nukleární RNA, malé nukleolární RNA, antisense RNA a transferové RNA. KD mají schopnost převádět messengerovou RNA na proteiny. Ony totiž disponují funkčními faktory, které zpracovávají premessengerovou RNA uvnitř jader jiných typů

buněk. Aktivace receptorů KD, indukuje specifické štěpení premessengerové RNA v cirkulujících KD. Primární nádory ovlivňují RNA profily KD. Kromě messengerové RNA obsahují KD také nekódující RNA a malé RNA. U nekódující RNA se odhalilo 20 pozměněných genů, které vykazovaly nádorový specifický profil. Důležitou roli ve funkci KD hraje také mikro RNA. Přímo či nepřímo ovlivňuje dezintegrinovou metaloproteinázu 9 a ADP receptor P2Y12, který je podrobněji popsán v kapitole 4.1.3. Jeho inhibice u myší významně snižovala agregaci KD. (L. Plantureux et al., 2018)

2.6 Koagulační kaskáda



Obrázek 3 *Koagulační kaskáda a působení koagulačních faktorů při tvorbě trombu:Vnitřní a vnější koagulační systém se spojí do jednoho systému u aktivace faktoru X. Ta poté reaguje s faktorem V. Při vzniku trombinu dostanou signál proteiny C a S (PC a PS) a trombomodulin. Jejich cílem je zastavit aktivaci V a VIII, aby se dále nevytvářel trombin. TFPI je inhibitor tkáňového faktoru. (převzato a upraveno dle J. Bauera, 2010)*

V krvi cirkuluje řada koagulačních faktorů v neaktivní formě. Většina z těchto faktorů jsou serinové proteázy. Aktivní formy jsou označeny malým písmenem a, za římskou číslicí, která označuje odpovídající faktor. Koagulační kaskáda je rozdělena na vnější, vnitřní a společnou cestu, ale nezahrnuje to interakci se složkami buněčné stěny. Současné koncepce koagulace rozlišují mezi iniciační, amplifikační (zesilující), propagační a stabilizační fází. V těchto drahách je zahrnuto několik zesilovacích smyček, například pro robustní tvorbu trombinu v interakci s aktivovanými KD. V koagulační kaskádě se faktory IX a XI účastní aktivačních smyček a pokračuje díky nim přeměna fibrinogenu na fibrin, dokud nejsou inhibovány inhibitorem TF. (J. Arnhold, 2020, W. E Winter et al., 2017)

Na obrázku 3 je vidět, že při poškození tkáně začíná vnitřní koagulační kaskáda a reagují povrchové glykoproteiny (prekalikrein a vysokomolekulární kininogen) přítomné na subendoteliálních buňkách, jako jsou buňky hladkého svalstva a fibroblasty. Ty reagují s faktorem XII, ten se aktivuje a následně aktivuje faktor XI a ten poté pomocí Ca^{2+} aktivuje IX. IXa tvoří tenázový komplex se svým kofaktorem VIIIa na povrchu buněčných membrán obsahujících fosfatidylserin (PS) za přítomnosti Ca^{2+}. Tenázový komplex převádí X na Xa. Aktivace TF nastává při první fázi hemostázy. TF je membránový receptor a proteinový kofaktor potřebný pro zahájení vnější koagulační kaskády. Při vzniku komplexu TF/VII se aktivuje faktor VII a zesiluje se jeho katalytická účinnost při konverzi faktoru X na jeho aktivovanou formu. Vždy se katalytická účinnost zvyšuje za přítomnosti Ca^{2+} a povrchu aniontových fosfolipidů. Při přítomnosti faktoru Xa je posíleno přežití buňky. Proteáza Xa z buněčných membrán exprimujících PS se reverzibilně spojuje s kofaktorem Va za přítomnosti Ca^{2+} a tvoří protrombinázový komplex. Ten přeměňuje protrombin na serinproteázový trombin, což je jeho aktivovaná forma. Trombin je enzym katalyzující přeměnu fibrinogenu na nerozpustný fibrin a aktivuje KD. (J. Arnhold, 2020, A. Mitrugno et al., 2016)

Fibrin je stabilizován pomocí faktoru XIIIa a spolu s primární hemostatickou zátkou vytvoří definitivní koagulum. A nakonec může nastat poslední fáze fibrinolýza, kdy se trombus rozpouští. (W. E Winter et al., 2017, J. Bauer, 2010)

Při zánětlivých stavech a při vaskulárních poraněních je TF exprimován endoteliálními buňkami a monocyty. To často vede k hyperkoagulaci a zvyšuje tendenci k rozvoji trombózy. Je známo, že CRP (viz 5.2.1) zvyšuje regulaci TF. Existuje totiž také vzájemná souhra mezi zánětem a koagulací. (J. Arnhold, 2020)

2.6.1 Význam jater pro koagulační kaskádu

Jak koagulační, tak antikoagulační proteiny jsou primárně vytvářeny v játrech. Většina koagulačních faktorů je syntetizována parenchymovými buňkami jater (faktory I, -II, -V, -VII, -IX, -X; proteiny C, S, fibrinogen, antitrombin a plazminogen), zatímco faktor VIII je produkován jaterními sinusovými endoteliálními buňkami. Faktory II, -VII, -IX, -X a proteiny C a S jsou závislé na vitaminu K – důležitém kofaktoru pro regulaci koagulace. Játra jsou primární úložiště tohoto vitaminu. Žlučové kyseliny pomáhají se vstřebáváním vitamínu K z potravin. Játra také regulují antikoagulanci odstraněním aktivovaných koagulačních a fibrinolytických faktorů prostřednictvím jaterního retikuloendoteliálního systému z krevního řečiště. Rozpoznání glykanů KD receptorem Ashwell-Morell vede k vychytávání KD

hepatocyty, makrofágy a dalšími imunitními buňkami jater a sleziny. (Preeti Kanika M. et al., 2021) (více viz 4.2.2)

2.7 Žilní tromboembolická nemoc

Žilní tromboembolismus (VTE) se skládá ze dvou nemocí. Při VTE se nejčastěji tvoří trombus v hlubokých žilách dolních končetin, tříslech nebo pažích. Zde se jedná o DVT (viz 2.7.3) poté, když se trombus odlomí a cestuje krevním oběhem až do plic, tak se jedná o PE (viz 2.7.2). Proto jsou rizikové faktory pro PE i DVT stejné (viz 2.7.4 – 2.7.6). VTE je celosvětově hlavní příčinou úmrtí a invalidity u lidí z důvodu nevědomosti o této nemoci. Za účelem zvýšení globálního povědomí o zátěži související s trombózou počínaje rokem 2014 vyhlásila Mezinárodní společnost pro trombózu a hemostázu 13. říjen jako Světový den trombózy. Výskyt VTE je vyšší u žen než u mužů a zvýšený u pacientů s rakovinou ve srovnání s pacienty bez ní. Studie ukazují, že u lidí evropského původu je také zvýšený výskyt VTE ve srovnání s neevropany. (Ashorobi D. et al., 2022, V. Vyas et al., 2022, Am. Wendelboe et al., 2015)

2.7.1 Trombofílie

Trombofilie je klinický stav, při kterém dochází k nerovnováze přirozeně vyskytujících se proteinů nebo faktorů srážení krve. Tedy kdy máme buď zděděné, nebo získané abnormality hemostázy, které nám určují protrombotický stav. To může způsobit riziko vzniku trombů, a proto lidé s trombofilií mohou mít predispozice ke vzniku VTE, tedy riziku vzniku DVT nebo PE. Tromby mohou také způsobit infarkt a mozkovou mrtvici, zde se jedná o aterotrombózu. (E. Campello et al., 2019, Ashorobi D. et al., 2022)

Trombofilie nezpůsobuje žádné příznaky, takže pacient možná ani neví, že ji má, až do doby, než se u něj objeví trombus. Příznaky trombózy se liší v závislosti na předpokládané lokalizaci a ostrosti. U pacientů s DVT se často vyskytuje izolovaný otok končetiny, bolest, teplo a otok v místě blokády. Pacient typicky popisuje bolest, jako „křeče“ nejčastěji lokalizované v lýtku nebo stehně, ale může se vyskytnout na kterékoli končetině. Mohou vykazovat snížený rozsah pohybu končetiny, neschopnost chůze nebo vyzařování bolesti. U pacientů s PE se mohou vyskytovat pleuritické bolesti na hrudi, dušnost, kašel, únava, horečka, bolest zad, synkopa nebo dokonce i smrt, pokud je PE závažná. Pokud dojde k trombóze v jedné z mozkových tepen, příznaky mohou zahrnovat akutní nástup jednostranné nebo oboustranné slabosti, bolesti hlavy, zmatenost, změny vidění, porucha řeči, obtíže s polykáním, brnění a mravenčení, potíže s chůzí nebo otevřenou paralýzu jedné nebo více končetin. (Ashorobi D. et al., 2022)

2.7.2 Plicní embolie

K embolii může dojít v různých částech těla a díky tomu je můžeme rozlišit. Záleží na příčině vzniku a způsobuje různé příznaky. Nejčastější embolií je TEN, kdy jde o uvolněný trombus. Například tyto 3 jsou nejznámější: PE, arteriální (embolie v tepně), mozková, ale existují i méně známé, jako embolie sítnice. Poté známe další druhy embolií, které způsobují jiné částice, jako je vzduch, tuk, které se mohou dostat do cév a způsobit opět stejnou škodu v těle. (V. Vyas et al, 2022)

Nastává při zablokování jedné z plicních tepen. Dochází k tomu, když se dostane z hluboké žíly na končetinách, nejčastěji ze stehna nebo z pánve, které jsou pravděpodobnější místa původu než spodní části nohy či jiné části těla, odlomí a pohybuje se krevním oběhem až dosáhne pravé komory srdce. Nakonec se dostane do plicního oběhu a zablokuje přívod krve do plic, kde obvykle dochází k výměně plynů. Velmi vzácně může nastat v důsledku embolizace jiných materiálů do plicního oběhu, jako je vzduch, tuk nebo například i nádorové buňky. PE jsou typicky mnohočetné, dolní laloky jsou postiženy častěji než horní a oboustranní postižení plic je ještě častější. Velké embolie mají tendenci zablokovat přímo hlavní plicní tepnu, tak se tato embolie nazývá sedlová. Sedlová se jí říká díky tomu, že se trombus zasekne právě v místě, kde se tato tepna větví do tvaru Y. Je to nebezpečné z důvodu, že embolus blokuje jednu či více plicních tepen, a to může vést až k srdečnímu selhání nebo smrti. Menší embolie blokují periferní tepny, a to může vést k plicnímu infarktu, který se projevuje intraalveolárním krvácením. Větší výskyt PE je u mužů než u žen. (V. Vyas et al, 2022)

2.7.3 Hluboká žilní trombóza

DVT je stav, kdy se v žilách vytvoří trombus a ten brání správné cirkulaci krve v těle. Nejčastěji se rozvíjí v nohách (stehno, lýtko, pánev nebo další část dolní končetiny), když něco zpomalí nebo se změní tok krve. Zřídka se projevuje na jiných částech těla, jako jsou paže, žíly v břiše a mozku atd. Tyto tromby v žilách nakonec zničí chlopně žil a mohou způsobit chronické problémy související s žilní nedostatečností. Ke srážení může dojít z několika důvodů, dále jsou popsány 3 hlavní faktory. (J. Thachil, 2014, F.R.T. Nelson et al., 2015)

Pomalý pohyb krve v oběhu, který je způsobený obvykle imobilitou, zejména po operacích (břicha, dolních končetin, sádrová dlaha při poranění nohy atd.), nadváhou, dlouhým sezením (v autě, letadle, kde se prosedí více než 4 hodiny…). Dalším důvodem je hustší krev, kde někteří jedinci mají zděděný sklon k tvorbě trombů, tedy mají trombofilii,

dále se může zahustit krev například i perorální antikoncepcí nebo jakokoliv hormonální substituční léčbou. Posledním z těchto tří hlavních faktorů je poškození žilní výstelky následkem zavádění dlouhých intravenózních katetrů, chemoterapiemi, operacemi, zánětem cév nebo se mohla poškodit i po prodělané DVT. (J. Thachil, 2014)

2.7.4 Vrozené rizikové faktory TEN

Na vzniku se vždy spolupodílí několik rizikových faktorů. Známe 4 typy faktorů, jako jsou vrozené rizikové faktory, získané rizikové faktory ovlivnitelné a neovlivnitelné (např. vyšší věk) a vlivy zevního prostředí. Posuzujeme tato rizika na základě jejich klasifikace a díky tomu je můžeme rozdělit do těchto čtyř kategorií. Každá se svým vlastním způsobem může podílet na vzniku TEN. (D. Musil, 2009)

Mezi vrozené rizikové faktory patří vrozené koagulační poruchy, jako jsou mutace FV Leiden, mutace protrombinu 20210, deficit antitrombinu III, deficit proteinu C a proteinu S a dysfibrinogenemie (abnormálně se syntetizuje fibrinogen). (M.A. Escobar, 2019, D. Musil, 2009)

Mutace FV Leiden (Leidenská mutace) - Faktor V Leidenská trombofilie neboli Leidenská mutace je název odvozený od mutace faktoru V. Je to dědičná porucha srážení krve, která může vést ke vzniku trombů v nohou, plicích nebo jiných částech těla. A představuje nejznámější dědičnou predispozici k žilní trombóze. Způsobuje rezistenci aktivovaného proteinu C, který za normálních podmínek se svým kofaktorovým proteinem S inaktivuje VIII a tento faktor V. Každý člověk na světě má tento protein ve své krvi, ale někteří z nás mají zmutovanou verzi, což způsobuje tuto specifickou Leidenskou mutaci. Lidé mohou mít jednu nebo dvě kopie zmutovaného genu faktoru V, což určuje pravděpodobnost komplikací. Zdědění jedné kopie mírně zvyšuje vaše riziko vzniku trombů, ale zdědění dvou kopií, tedy od každého z rodičů jednu, by významně zvýšilo riziko pro vznik trombů. (E.M. Van Cott et al., 2015)

Mutace protrombinu 20210 (mutace faktoru II) - Genová mutace protrombinu G20210A je druhou nejčastěji dědičnou trombofilií po faktoru V Leiden. Mutace je výsledkem substituce guaninu za adenin na pozici 20210 protrombinového genu na chromozomu 11. Tato mutace způsobuje zvýšené hladiny protrombinu, které vedou k žilní tromboembolii. (S. Elkattawy et al., 2022)

2.7.5 Získané rizikové faktory

Získané neovlivnitelné rizikové faktory máme 3 hlavní, kterými jsou věk, rodinná anamnéza a získané koagulační poruchy, mezi které patří získaná rezistence aktivovaného

proteinu C, získaný deficit antitrombinu III, deficit proteinu C a proteinu S, zvýšení fibrinogenu, zvýšená aktivita faktoru VIII, IX, XI a antifosfolipidové protilátky. (D. Musil, 2009)

Mezi získané ovlivnitelné rizikové faktory patří obezita, varixy na nohách (kde zůstává krev v nohách, protože chlopně v povrchové žíle nefungují správně), chronická onemocnění, akutní onemocnění, závažné infekce, nádorová onemocnění, myeloproliferativní poruchy, nefrotický syndrom, těhotenství a šestinedělí, ale i např. COVID-19. (D. Musil, 2009)

2.7.6 Vlivy prostředí

Pod vlivy prostředí spadá operace, trauma, sádrová fixace, některé léky (ženské hormony), centrální žilní katétr, dlouhé cestování (nad 8 hodin), dlouhodobé upoutání na lůžko, nezvyklá fyzická námaha. (V. Vyas et al., 2022)

3 Riziko TEN u interních pacientů

Zdravotní stav interních pacientů je často komplikován záněty, které mohou mít různý stupeň závažnosti a v případě infekčního původu přejít až v sepsi. V rozvoji zánětu hraje roli vazba podoplanin-CLEC-2, kde dochází k aktivaci a agregaci KD (pojednáno v kapitole 4.1.2) a pojí se s ním také vznik NET, které např. pomáhají k poškození endoteliálních buněk a vychytávání větších patogenních látek (pojednáno v kapitole 4.3). (Muxin Y. et al., 2020, K. Suzuki-Inoue, 2019)

3.1 Akutní interní onemocnění

Tyto nemoci jsou spojené s vysokým rizikem TEN. V těchto případech se jedná o srdeční selhání, respirační onemocnění, infekce, infarkt myokardu, mozkovou mrtvici atd. Celkové riziko je ovlivněno rizikovými faktory (viz.2.11), u každého individuálního nemocného jedince se mohou lišit. (D. Musil, 2009)

U akutních interních onemocnění je vysoká prevalence flebotrombózy, což činí 28–33 %. Tato data byla zjištěna na interních jednotkách intenzivní péče. Pitevní studie ukázaly, že pouze 25 % pacientů, kteří zemřeli v nemocnici na akutní PE, prodělalo v nedávné době operaci. Zbylých 75 % tvořili imobilní pacienti s interními chorobami. „Již práce ze 40. let 20. století popisující pitevní nálezy u 351 pacientů, kteří byli před smrtí dlouhodobě upoutáni na lůžko, prokázala bércovou trombózu v 53 % případů a PE byla příčinou smrti u 15 % nemocných. Autoři spekulovali, že bércová trombóza může vést při progresi na stehno k PE. Pozdější práce tuto jejich domněnku potvrdily.“ Celkem je mortalita interních pacientů, kteří byli přijati k hospitalizaci, okolo 10 % a jeden z deseti umírá na akutní PE. Fatální PE je

hlavní příčinou náhlé smrti u hospitalizovaných interních pacientů. Odhaduje se, že bez vhodného preventivního předcházení trombózy (tromboprofylaxe) umírá na fatální PE každý dvacátý pacient hospitalizovaný na interním oddělení. (D. Musil, 2009)

3.1.1 Imobilizační syndrom

Otázky, jak vzniká a proč je imobilizační syndrom neboli „syndrom nehybnosti" důležitý a musíme si na něj dávat pozor je, že při situaci, kdy se pacient dostane do nemocnice na interní oddělení či ho propustí domů po nějakém zákroku se často stává, že se přestane pohybovat z důvodu bolestí či únavy a pouze sedí nebo leží, je tzv. upoután na lůžko po delší dobu. V důsledku toho mohou být narušeny muskuloskeletální, oběhový a dýchací systém, stejně jako kognitivní funkce, proto se klinické příznaky související se syndromem imobility mohou lišit a mohou zahrnovat svalovou slabost, protože ztrácí svalovou hmotu kvůli nehybnosti, je zde i ztuhlost kloubů, osteoporóza, snížená funkce srdce a plic, DVT a kognitivní poruchy, jako například problémy s pamětí. (Yoshinori M. et al, 2021)

3.1.2 Flebotrombóza a tromboflebitida

Tromboflebitida je zánětlivé onemocnění povrchových žil spojené s žilní trombózou, která při migraci trombu může přejít až v zánět hlubokých žil v dolních končetinách. Je spojována se vzn. DVT a PE. Povrchová tromboflebitida může postihnout většinu povrchových žilních systémů, tedy se také může dostat i do hrudní stěny a paže, kde způsobuje různé choroby a syndromy. Migrující trombus se může také něčím infikovat a stává se septickou tromboflebitidou. Flebotrombóza je závažná porucha krevního oběhu, která může být způsobená řadou faktorů, například i zánětlivým onemocněním žilní stěny. Rozdílem mezi nimi je, že u flebotrombózy se mohou vyskytovat malignity či poruchy koagulace, ale u tromboflebitidy ne, tu naopak můžou doprovázet Buergerova choroba (nemoc nervů a cév) a jiné systémové záněty. Poté co se objeví u flebotrombózy zánět a trvá nějakou dobu, tak se objevuje postflebitický syndrom, kde nastává chronická žilní nedostatečnost dolních končetin v důsledku DVT. Při vývoji se ztratí funkce chlopní v žilách, umožňuje shromažďování krve a způsobuje otoky, bolest, také se v hlubokých žilách vytváří jizvy, které zesílí stěnu žil. Dále i vředy na nohou či křečové žíly. (H.J. Leu et al., 1996, F.R.T. Nelson et al., 2015, H. NasrNasr et al., 2015)

Křečové žíly jsou degenerativní stav žil, při kterém se svalová vlákna ve stěnách cévy natahují, čímž ztrácejí elasticitu. Chlopně se stanou nekompetentními a krev padá zpět špatným směrem, což vytváří reflux a další selhání stěny. Zpětný tok se stává neúčinným, způsobuje bolest, citlivost a otok. (F.R.T. Nelson et al., 2015)

4 Souvislost nádorového onemocnění se vznikem tromboembolie

Hyperkoagulace je jeden z nejčastějších projevů u nádorových onemocnění v těle člověka a je velkým předpokladem k metastatickému šíření nádoru. S tím je spojená menší smáčivost a snížená antitrombotická aktivita buněk cévního endotelu a usnadňuje to adhezi CTC. Nádorové buňky prostřednictvím svých specifických či nespecifických faktorů mohou přímo aktivovat systém krevního srážení, indukovat prokoagulační anebo tlumit antikoagulační schopnosti endotelu cév, KD, monocytů a makrofágů. Ke zvýšené produkci trombinu vede nadprodukce mnoha prokoagulancií, obzvláště TF. Kromě toho, že nádor přímo zasahuje do systému koagulace a primární hemostázy, se na trombogenezi podílí i narušení funkce a integrity cévního endotelu nádorem, vedoucí k aktivaci koagulace anebo se omezí průtok cévou utlačovanou nádorem. Následně dochází ke kumulaci aktivovaných koagulačních faktorů a KD. Ne vždy jsou na vině pouze nádorové buňky, mohou jimi být i některé komplikace nádorového onemocnění, které též podporují vznik trombu, jako jsou orgánové poškození, sepse, změny vnitřního prostředí a terapeutické zásahy směřované proti nádoru (chemoterapie, hormonální terapie, antiangiogenní léčba, centrální žilní katétry). Na vzniku VTE se u nádorových pacientů podílejí i další faktory jako jsou např. věk, imobilizace, operace a další. Laboratorními testy prokážeme, zda se vyskytují změny některých komponent při vyšetření. U pacientů s karcinomem žaludku, střeva a lymfomy se v některých případech ukazují zvýšené koncentrace fibrinogenu, zkrácení koagulačních časů a často též trombocytóza. A také vzestup počtu KD neznamená vždy hned vznik hyperkoagulace, ale se současnou aktivací prokoagulačních faktorů jejich zvýšení napomáhá utvoření trombóz. V krvi se KD pohybují v neaktivním stavu, ale po stimulaci s aktivátory (trombin, prostaglandiny, ADP, adrenalin a další látky produkované nádory) se zvyšuje jejich spontánní agregace a adhezivita. (B. Kadlec a kol., 2010)

4.1 Mechanismy vniku nádorové trombózy

K hlavním mechanismům vzniku a rozvoje nádorové trombózy patří exprese hemostatických proteinů nádorovými buňkami (prokoagulační proteiny), tvorba mikročástic (MPs), zánětlivých cytokinů (tj. TNF-α a IL-β) a proangiogenní a růstově stimulačních faktorů (VEGF, základní fibroblastový růstový faktor atd.) nádorovými a/nebo hostitelskými buňkami. Nádorové buňky aktivují KD sekrecí molekul anebo přímou adhezí buněk. Při expresi adhezních molekul se vážou KD, ale také endoteliální buňky a leukocyty. Tyto mechanismy vedou k agregaci a nazývají se „agregace trombocytů indukovaná nádorovými buňkami.“ (A. Falanga et al., 2017)

4.1.1 Prokoagulační proteiny a heparanáza

Mezi hlavní **prokoagulační proteiny** patří TF (přezdívaný tromboplastin) a rakovinový prokoagulant (CP). TF přímo ovlivňuje expresi VEGF jak zhoubnými, tak hostitelskými endoteliálními vaskulárními buňkami. Tato vlastnost poskytuje důležitou vazbu mezi aktivací koagulace, zánětem, trombózou, růstem nádoru a metastázami. TF je primárním iniciátorem krevní srážlivosti a normálně se vylučuje z krevního oběhu, pokud není vystaven cirkulujícímu koagulačnímu faktoru VII při poškození cév, aby nastala koagulační kaskáda a mohly společně aktivovat faktor X a následovala tvorba trombinu a aktivace KD. CP, na rozdíl od TF, přímo aktivuje faktor X nezávisle na koagulačním faktoru VII. Detekuje se v různých maligních buňkách. (N. Kerk et al., 2010, A. Falanga et al., 2017)

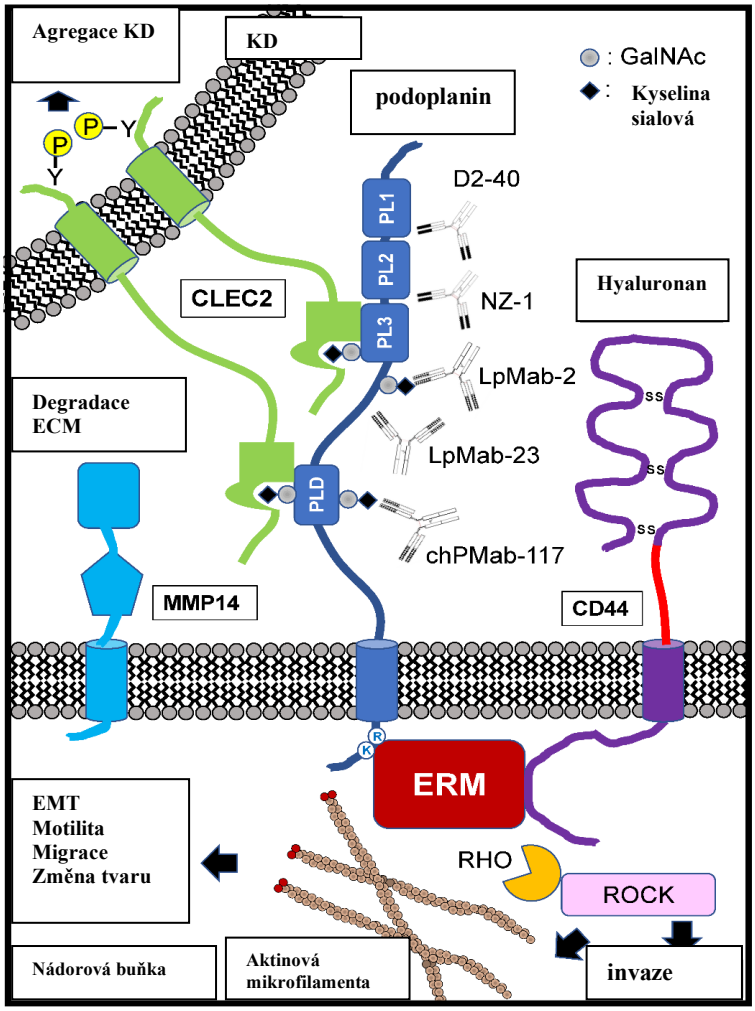
Mezi dalšími prokoagulačními aktivitami nádorových buněk nabývá na významu **enzym heparanáza.** Ta slouží k degradaci extracelulární matrice, zvyšuje expresi iniciátoru TF a interaguje s inhibitorem TF na buněčné povrchové membráně endoteliálních a nádorových buněk. Heparanáza zvyšuje koagulační aktivitu povrchu buněk a aktivitu TF, to vede ke zvýšené produkci faktoru X a následné aktivaci koagulačního systému. (N. Kerk et al., 2010, A. Falanga et al., 2017)

4.1.2 Podoplanin a CLEC-2

Některé nádorové buňky k aktivaci KD používají **podoplanin**, to je transmembránový glykoprotein, který je na povrchu nádorových buněk. Jeho zvýšené hladiny jsou spojovány s metastázami nádoru nebo s maligní progresí. Je také exprimován v různých druzích normálních buněk, včetně podocytů v ledvinách, odkud tento název vnikl, alveolárních buňkách typu I v plicích, lymfatických endoteliálních buňkách, ale nikoliv ve vaskulárních endoteliálních buňkách. (K. Suzuki-Inoue, 2019, A. Falanga et al., 2017)

Podoplanin se skládá z krátkého cytoplazmického konce, transmembránové části a N-terminální extracelulární domény s množstvím Ser/Thr zbytků jako potenciálních O-glykosylačních míst (viz obrázek 4). Asi polovina molekulové hmotnosti podoplaninu pochází z cukerných řetězců typu O. O-glykosylační místa obsahují N-acetyl-galaktosamin, který je modifikovaný kyselinou sialovou. Podoplanin má 3 domény PLAG („platelet aggregation-stimulating“), jejichž funkce je indukovat agregaci KD. Dále byly identifikovány domény s podobnými sekvencemi - PLD (PLAG-like domain), a jedena z nich byla pojmenována PLAG4. PLAG domény se tandemově opakují a nacházejí se v extracelulární části. Struktura podoplaninu postrádá zřejmé enzymatické motivy, tak provádí své buněčné funkce v cytoplazmatické doméně prostřednictvím interakcí protein-protein. Jeho

cytoplazmatická koncovka obsahuje bazické aminokyselinové zbytky, které jsou vazebným místem pro protein ezrin/radixin/moesin (ERM). ERM připevňuje aktinový cytoskelet k plazmatické membráně a interaguje s RHO GTPázami a jejich RHO-asociovanou proteinkinázou. Tím je podpořena reorganizace a kontraktilita aktinového cytoskeletu za účelem buněčné migrace, motility, epitelo-mezenchymálního přechodu, a to vede ke stimulaci intravazace a kolonizace vzdáleného orgánu. Při interakci podoplanin-ERM se objevují specializované výběžky buněčného povrchu, nazývané invadopodia, podílející se na invazi nádorových buněk. (K. Suzuki-Inoue, 2019, H. Suzuki et al., 2022, M. Quintanilla et al, 2019)



Obrázek 4 *CLEC-2 a podoplanin: podoplanin je transmembránový glykoprotein a skládá se z extracelulární domény, transmembránové části a krátkého cytoplazmatického konce. Extracelulární doména obsahuje 4 domény (PLAG1-3 a PLD) a na nich O-glykosilační místa, které obsahují N-acetyl-galaktosamin (GalNAc), který je modifikovaný kyselinou sialovou. CLEC-2 je receptor na KD a rozpoznává jak doménu PLAG3, tak PLD. Indukuje fosforylaci tyrosinu (PY), aktivaci a agregaci KD. Na cytoplazmatickém konci podoplaninu jsou bazické zbytky (RK), které fungují jako vazebná místa pro proteiny ezrin-radixin-moesin (ERM), které modulují aktivitu RHO GTPáz a jejich RHO-asociované proteinkinázy (ROCK) a podporují reorganizaci aktinového cytoskeletu za účelem podpory buněčné migrace, motility a epitelo-mezenchymálního přechodu (EMT). Podoplanin interaguje s hyaluronanovým receptorem CD44 a matricovou metaloproteinázou 14 (MMP14), čímž podporuje vazbu hyaluronanu a degradaci extracelulární matrice (ECM). Monocytární protilátka NZ-1 rozpoznává doménu PLAG2/3 a monocytární protilátka D2-40 identifikuje doménu PLAG1/2. Vykazují neutralizační aktivitu pro interakci podoplanin–CLEC-2 a inhibují podoplaninem indukovanou agregaci KD a metastázy. Nádorově specifická monoklonální protilátka na podoplanin (Mab). (převzato a upraveno dle H. Suzuki et al.,2022)*

Podoplanin interaguje s hyaluronanovým receptorem CD44, čímž podporuje vazbu hyaluronanu, která zprostředkovává migraci buněk. Podoplanin také interaguje s matricovou metaloproteinázou 14 tím, že tvoří komplex a dochází k degradaci a remodelizaci extracelulární matrice, aby nádorové buňky mohly napadat okolní tkáň (invaze). (H. Suzuki et al., 2022, M. Quintanilla et al, 2019)

Zvýšená exprese podoplaninu u zhoubných stavů závisí na transkripčním aktivačním proteinu. Ten působí prostřednictvím signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) s Akt (proteinkináza B) - (dráha PI3K–Akt viz 4.2.1) např. v kožních nádorech. Jedna ze složek transkripčního aktivačního proteinu je fos a přímo se váže na hlavní část podoplaninu a usnadňuje jeho expresi. Dále je podoplanin exprimován u infekčních a zánětlivých onemocnění. Může nastat exprese podoplaninu v makrofázích a v Kupfferových buňkách v játrech např. po infekci salmonelou, kdy dojde vlivem infekce k porušení cévní stěny (viz níže 4.2.2). Jeho exprese je indukována TNF-α, IL-β. Zánětlivé cytokiny také indukují expresi podoplaninů různými mechanismy v závislosti na podmínkách. Podoplanin v nádorových buňkách a normálních buňkách v místech zánětu je tedy regulován cestou PI3K–Akt–transkripčního aktivačního proteinu a zánětlivými cytokiny. (K. Suzuki-Inoue, 2019)

Podoplanin se váže na destičkový aktivační receptor, **C-typ lektin-like receptor 2 (CLEC-2)** a tím usnadňuje hematogenní metastázy nádoru a trombózu spojenou s nádorem. Vazba CLEC-2 a podoplaninu pro nezávislou agregaci KD je uskutečněna pomocí dvou domén s O-glykosylačními místy s disialylovým jádrem na Thr52 v PLAG3 nebo PLAG4. Vazba podoplanin-CLEC-2 probíhá přes karboxylové skupiny ze zbytků kyseliny sialové na podoplaninu. Doména PLAG1/2 je rozpoznávaná monoklonální protilátkou D2-40 a PLAG2/3 jsou rozpoznávané monoklonální protilátkou NZ-1. Tyto protilátky mají neutralizační aktivitu pro interakci podoplanin a CLEC-2 a inhibují podoplaninem indukovanou agregaci KD a hematogení metastázy. Existuje nádorově specifická monoklonální protilátka LpMab, která rozpoznává glykopeptid v lidském podoplaninu, ale reaguje pouze na exprimovaný na nádorech, nikoli na normálních buňkách. Podoplanin v normálních tkáních nemá přístup ke CLEC-2 u KD a vazba se objevuje u patologických stavů. (K. Suzuki-Inoue, 2019, H. Suzuki et al.,2022, M. Quintanilla et al, 2019)

CLEC-2 také slouží jako receptor pro trombocytoaktivující hadí jed, rhodocytin. Ten se může vázat na CLEC-2 bez přítomnosti sacharidů, a tím agregovat KD. CLEC-2 se nachází v KD, megakaryocytech a v menším množství v Kupfferových buňkách. Aktivační signály zprostředkovává CLEC-2 v závislosti na proteinu tyrosinkinázy. Má na svém cytoplasmatickém konci signalizační motiv zvaný „hemi-ITAM“ (motiv aktivace na bázi

imunoreceptorových tyrosinů). Interakce CLEC-2 vede k tyrosinové fosforylaci hemi-ITAM pomocí Src kináz a navázání slezinné tyrosinkinázy (Syk). Src jsou onkoproteiny, které se účastní procesu přenosu signálu v buňce. Syk přenáší signalizaci adaptivních imunitních receptorů a také zprostředkovává další biologické funkce včetně buněčné adheze, přirozeného imunitního rozpoznávání, aktivace KD a je vysoce exprimována všemi buňkami hematopoetické linie. Díky nimž postupně dojde k aktivaci a agregaci KD. (A. Mócsai et al., 2016, K. Suzuki-Inoue, 2019, H. Suzuki et al.,2022)

4.1.3 Aktivace KD

Nádorové buňky aktivují KD interakcí mezi membránovým proteinem na povrchu nádorových buněk a jeho specifickým receptorem na KD a usnadňují tvorbu trombu tím, že nepřímo působí na endoteliální buňky nebo leukocyty. (K. Suzuki-Inoue, 2019)

Funkce KD do značné míry závisí na signalizaci za pomocí integrinů. Integrin nádorových buněk αvß3 se může navázat na integrin KD αIIbß3 i α6β1 a zprostředkovává interakci nádorových buněk a KD. Váže je prostřednictvím proteinů jako jsou fibrinonektin a fibrinogen. (V.H. Almeida et al., 2019)

Nádorové buňky mohou aktivovat KD i sekrecí rozpustných faktorů, jako jsou ADP, tromboxan A2, katepsiny, matrixové metaloproteinázy a trombin. Nádorové buňky uvolňují ADP v extracelulárním prostředí a existují dva ADP receptory P2Y1 a P2Y12, které jsou spřažené s G proteinem a se podílejí se na aktivaci/agregaci KD, změnách jejich tvaru a potencují degranulaci po stimulaci tromboxanem A2. Tromboxan A2 je agonista KD a jeho receptor je také exprimovaný na KD a spřažený s G proteinem. (L. Plantureux et al., 2018, V.H. Almeida et al., 2019)

Katepsin K aktivuje KD prostřednictvím mechanismu závislého na G proteinových receptorech, jako jsou proteázou aktivované receptory 3 a 4, u několika typů rakoviny. Tyto receptory se nachází na KD. Mechanismus zahrnuje vazbu nádorové matrixové metaloproteinázy 2 na integrin (αIIbβ3) KD. Matrixová metaloproteináza pak štěpí a aktivuje proteázou aktivovaný receptor 1. Matrixové metaloproteinázy jsou členy endopeptidáz závislých na zinku a vápníku, které rozkládají extracelulární matrix. (V.H. Almeida et al., 2019, L. Plantureux et al.,2018)

Trombin je serinová proteáza a přeměňuje rozpustný fibrinogen na nerozpustná vlákna fibrinu, která stabilizují zátku při tvorbě trombu. Také aktivuje další koagulační faktory, jako jsou V, VIII, XI a XII, jež zesilují koagulační odpověď. Trombin je nejúčinějším fyziologickým aktivátorem KD. Mechanismem vychytávání a ukládání KD proteinů je

endocytická cesta. Endocytóza je totiž klíčovou cestou k vychytávání fibrinogenu do KD a je to spojeno s expresí integrinu αIIbß3. (V.H. Almeida et al., 2019, L. Plantureux et al.,2018)

Nadměrná exprese antitrombinu a povrchového receptoru inaktivujícího trombin má inhibiční účinek na růst nádoru. Podle některých studií však existují nádory, u kterých není funkce trombinu pro jejich metastazování nezbytná. Příkladem je maligní melanom, kde bylo zaznamenáno odlišné chování dvou fenotypově odlišných buněčných linií, MV3 a WM9. Obě aktivují protrombin v důsledku exprese TF. (N. Kerk et al., 2010)

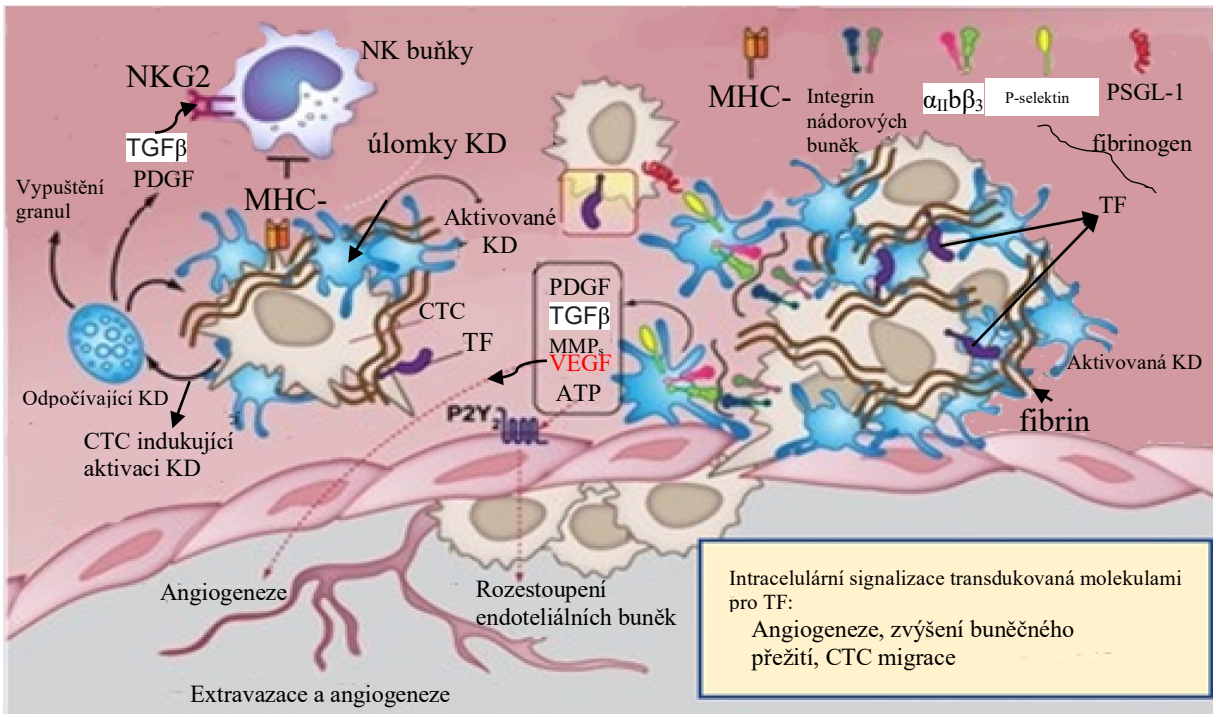
Trombinová akce podporuje nádorové šíření a metastazování zprostředkované štěpením a aktivací proteázou aktivovaného receptoru 1, který je exprimován KD, endoteliálními buňkami a především metastazujícími buněčnými liniemi. Matrixová metaloproteináza-1, vylučovaná nádorovými buňkami, je aktivátor proteázy aktivovaného receptoru 1. Nádorové supernatanty aktivují endoteliální buňky přes osu metaloproteináza-1/ proteázou aktivovaného receptoru 1. Při stimulaci MV3 dochází k přímé exocytóze protrombotického obsahu Weibelových-Paladových tělísek z endotelu, ve kterých se nachází VWF a P-selektin, a to způsobí zvýšené uvolňování VWF. Naproti tomu u WM9 se neindukuje žádné uvolnění VWF bez přítomnosti trombinu. WM9 ovlivňují endoteliální buňky prostřednictvím osy TF/trombin/ proteázou aktivovaný receptor 1, to má za následek vyšší expresi TF. (N. Kerk et al., 2010)

P-selektin je členem adhezních molekul závislých na Ca^{2+} a uchovává se v alfa granulích KD a v tělískách endoteliálních buněk (Weibelova-Paladova tělíska). Po buněčné aktivaci a degranulaci se P-selektin rychle exprimuje na membráně KD a endoteliálních buněk a váže se na mucinosní ligand PSGL-1 (P-selektinový glykoprotein ligand 1) exprimovaným převážně na leukocytech a nádorových buňkách. Nedostatek P-selektinu snižuje růst nádoru. Tento účinek je způsoben snížením počtu KD infiltrujících do solidních nádorů, snížením sekrece angiogenního faktoru VEGF, a to vede ke sníženému počtu agregátů nádorových buněk a KD v krevním řečišti. (L. Plantureux et al., 2018)

4.2 Interakce KD a nádorových buněk

Nádorové buňky migrují krevním řečištěm a jsou v něm vystaveny náročnému mikroprostředí, včetně smykových sil a cytotoxickým NK buňkám (přirozeným zabíječským buňkám). Mohou uniknout rozpoznání imunitním systémem zprostředkovaným NK buňkami a překonat smykové síly vytvořením mikroembolie bohaté na KD a fibrin. KD usnadňují adhezi nádorových buněk, jejich uvazování a zástavu pod smykovým prouděním. (A. Mitrugno et al., 2016)

KD mají na povrchu receptory jako je P-selektin a αIIbβ3, které slouží jako nádorové receptory (viz 4.1.3). Znázorněno na obrázku 5. Adhezi nádorových buněk k subendotelu se zabrání tím, že tyto receptory zablokujeme. Schopnost NK buněk lyzovat nádorové buňky klesá se zvyšujícím se počtem KD, které tvoří okolo nádorových buněk plášť a díky tomu maskují nádorové buňky, aby mohly uniknout pozornosti imunitního systému. Uvnitř pláště jsou usazeniny fibrinu a ty díky expresi TF na povrchu tvoří síť, ta zahaluje nádorové buňky (viz 4.2.2). Tedy TF je důležitý pro CTC, aby mohly přežívat. TGFβ a růstový faktor PDGF, odvozené z KD, mohou také bránit NK buňkám nalézt nádorové buňky, díky snížení exprese NK aktivujících imunitních receptorů (NKG2) a PDGF receptoru NK buněk. TGFβ způsobuje také vazbu KD s kolagenem, ale může nastat i vytvoření endoteliálního výklenku pomocí vazby trombocytů-kolagenu, u kterého se tvoří agregát. CTC se zachytí ve vytvořeném agregátu a TGFβ zprostředkovává nádorový výklenek a podpoří se nádorový růst. (A. Mitrugno et al., 2016, Ch. Thålin et al., 2019)



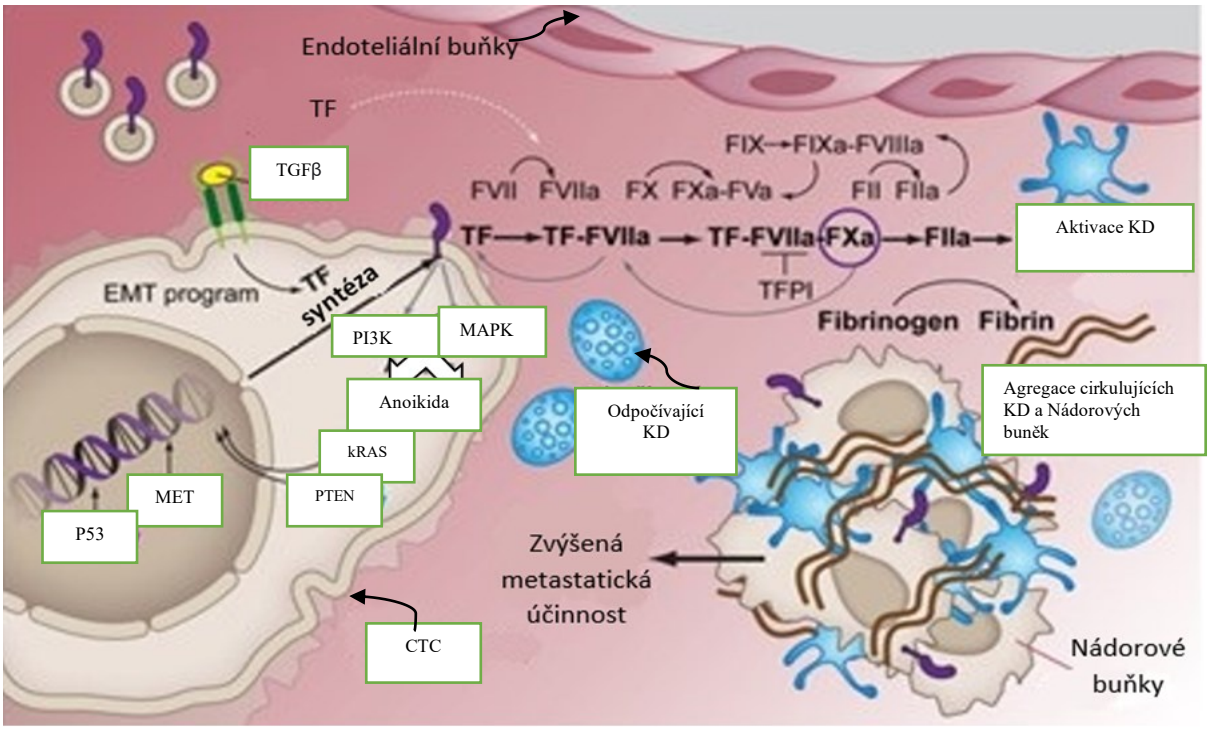
Obrázek 5 Koagulace a aktivace KD podporující nádorové metastázy: CTC se maskují před NK buňkami pomocí KD atd. Na obrázku je vidět přichycení CTC na KD pomocí integrinu, P-selektinu, TF a PSGL-1. TGFβ a PDGF brání NK buňkám nalézt nádorové buňky a CTC díky rozestoupení endoteliálních buněk může provést extravazaci a díky angiogenezi přijímat živiny a kyslík, a tak přežít. MHC – hlavní histokompatibilní komplex je blokován, aby ho NK buňka neviděla (převzato a upraveno dle A. Mitrugna et al., 2016)

Adhezivní molekuly vázané na KD, rozpustné molekuly odvozené z KD a fibrin zvyšují schopnost CTC projít endoteliální buněčnou bariérou, pronikat parenchymem a vytvořit metastazující léze. CTC aktivují a agregují KD, aby si zajistily přežití v krevním řečišti a umožnily extravazaci (pronikání do okolí tkáně), proliferaci a angiogenezi (obnova cév) v místě metastázy. K extravazaci nádorových buněk a tvorbě nových stabilních kapilár

v metastazujícím místě přispívá uvolňování růstových a angiogenních faktorů (např. PDGF, TGFβ, VEGF), proteáz (např. matrix metaloproteinázy (MMPs)) a adeninových nukleotidů (např. ATP) z KD. Při proniknutí do tkáně má nádorová buňka intimní spojení s krevním oběhem, aby nádor získal potřebný kyslík, živiny, zbavil se metabolických odpadních produktů a měl přístup k proteázám a cytokinům, které udržují další růst, invazi, šíření a extravazaci. Nádorové cévy mají výraznou propustnost, nadměrně a nahodile se větví, to umožňuje jejich přístup do oběhu. (A. Mitrugno et al., 2016)

4.2.1 Nádorové supresory

U CTC lze expresi TF (prokoagulačního proteinu) zvýšit vnitřními a vnějšími buněčnými cestami (Obrázek 6). Vnitřní cesta zahrnuje mutovanou aktivitu nádorových supresorů (p53 a PTEN) a/nebo onkogenů (kRAS a MET), které indukují transkripci a translaci genu TF. Vnější trasa je iniciována mimo buňku parakrinní signalizací TGFß. Cytoplazmatický TF je spojený s řadou transdukčních signálních proteinů (např. PI3K a MAPK), které se aktivují po intravazaci buněk, aby se zabránilo anoikidě (buněčné smrti, která nastává při odchlípení buněk od pevného povrchu). TF na povrchu CTC nebo na vylévaných mikročásticích odvozených z nádoru (MPs) zároveň iniciuje vnější koagulační kaskádu vedoucí k tvorbě trombinu a tím i k tvorbě fibrinu a aktivaci KD (A. Mitrugno et al., 2016).



Obrázek 6 *Cirkulující nádorové buňky (CTC): V CTC se v jádře nachází nádorový supresory a onkogeny, které indukují transkripci a translaci genu TF. V cytoplazmě je TF iniciován parakrinní signalizací skrz TGFβ, TF se syntetizuje v CTC a začne působit s PI3K a MAPK, které se aktivují po intravazaci buněk, aby se zabránilo anoikidě. TF mimo buňku nebo na*

ní zároveň aktivuje vnější koagulační kaskádu, a to vede k aktivaci KD. Ty se poté mohou navázat na CTC, aby ji chránily. (převzato a upraveno dle A. Mitrugna et al., 2016)

Nádorové supresory PTEN a p53 patří mezi nejčastěji inaktivované nebo mutované geny u lidských nádorů. PTEN reguluje stabilitu p53 a p53 zvyšuje transkripci PTEN. Po ztrátě PTEN je však dráha p53 silně aktivována. PTEN je protein, který je exprimován během rané embryogeneze. Má primární roli na plazmatické membráně, kde negativně reguluje aktivitu signalizace PI3K/Akt prostřednictvím přeměny fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátu (PIP3) na fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP2). PIP3 zprostředkovává signalizaci receptorové tyrosinkinázy k Akt. Aktivovaná Akt přenáší fosfátovou skupinu na cílové proteiny, které se podílejí na přežití buněk, jejich metabolismu, buněčném cyklu, růstu a migraci, které jsou také kritické pro vývoj nádoru. PTEN působí jako regulátor udržování bazálních hladin PIP3 pod prahem pro aktivaci signalizace. Mezi další jeho funkce patří regulace stability centromery, opravy DNA a ovlivnění apoptózy. Gen p53 umístěný na chromozomu 17p, působí při kontrole buněčného růstu a apoptóze. Protein p53 je transkripční faktor, který je schopen vyvolat zástavu G1 buněčného cyklu. Inaktivace genu p53 je běžnou událostí ve vývoji většiny typů rakoviny. PTEN a p53 se vzájemně ovlivňují a regulují na úrovni transkripce i proteinu, což by mohlo být důležitým kontrolním mechanismem pro přepínání mezi přežitím a smrtí. (A. Nakanishi et al., 2014, D.S. Russell et al, 2018)

Onkoprotein MET zvyšuje patologickou prokoagulační aktivitu nádorových buněk pomocí up-regulace inhibitoru plazminogenového aktivátoru typu 1. **KRAS** je onkogen nacházející se na krátkém raménku chromozomu 12 (12p). Kódovaný kRAS se spojuje s cytoplazmatickou GTPázou, aby přeměnil GTP na GDP a modifikoval transduktivní signály z cytoplazmy do jádra, a tím řídil buněčný růst a cesty přežití. Když je kRAS zmutován, GTP je zachováno a signál je trvale v „aktivním“ stavu. Aktivační mutace kRAS jsou přítomny v různých epiteliálních nádorech a vedou k aktivaci fosforylace mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), což vyvolává nukleární signály buněčné proliferace a progrese nádoru. (A. Mitrugno et al., 2016, A.M. Schwartz et al., 2012)

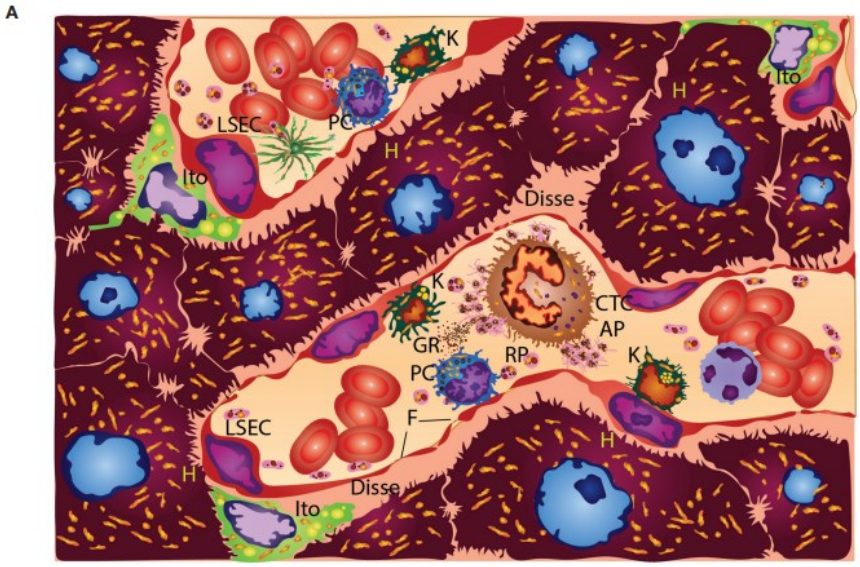
Nádorové buňky mají prokoagulační povrchy charakterizované expresí TF a PS, které jsou schopné vytvářet trombin a také endogenně syntetizují faktor VII. Komplex TF-VIIa organizuje signály přežití buněk díky své schopnosti aktivovat antiapoptické cíle, jako je MAPK a PI3K. (A. Mitrugno et al., 2016)

4.2.2 Příklad interakce nádorových buněk s KD v hepatocytech

Na obrázku 7 jsou znázorněné hepatocyty (označeno žlutým H), které zabírají podstatnou část objemu jater a jsou organizovány kolem sinusoidů. Jaterní sinusové

endoteliální buňky lemují stěny sinusu a mají kapiláry s otevřenými póry „fenestracemi“. Klidové Ito buňky mají hvězdicovitý tvar a obsahují lipocyty, vitamín A i váčky uchovávající tuk (žluté kapičky). Mezi rezidentní (vyskytující se v játrech neustále) imunitní buňky patří Kupferovy buňky, intrahepatální lymfocyty, pit buňky i NK buňky typické pro játra. Prostor Disse obklopuje sinusoidy a tvoří výklenek kmenových buněk, který ukrývá ito buňky hlídající a regulující jeho funkci. Volně migrují v prostoru Disse a přispívají k regeneraci, fibróze jater, kancerogenezi a metastázám. Tyto buňky kontaktují endoteliální buňky. CTC mohou stimulovat klidové KD k jejich aktivaci pomocí vazby podoplanin-CLEC-2 a uvolnit jejich uložený obsah granulí. (Preeti Kanika M. et al., 2021)

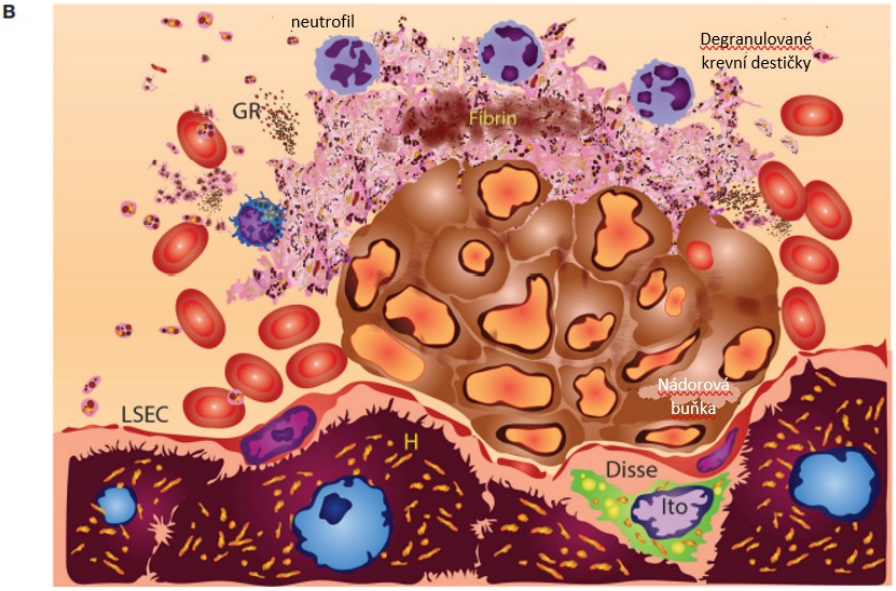
Výše bylo zmíněno o expresi podoplaninu v makrofázích a v Kupfferových buňkách v játrech např. po infekci *Salmonelou typhimurium*. Při infekci salmonelou se exprimuje podoplanin v těchto dvou buňkách v závislosti na Toll-like receptoru 4 a interferonu γ. Tyto buňky migrují do blízkosti vaskulárních endoteliálních buněk a interagují s KD, které pronikly přes poškozené cévy kvůli zánětu. Prostřednictvím interakce CLEC-2 a podoplaninu se KD aktivovaly a agregovaly, a to vede k tvorbě trombu v játrech. K trombóze dochází i po odstranění bakterií z krevního řečiště. Tedy bakterie přímo nestimulují tvorbu trombu. (K. Suzuki-Inoue et al., 2016)



Obrázek 7 *Putování nádorové buňky v játrech: CTC (cirkulující nádorová buňka), RP (klidové KD), AP (aktivované KD),GR (uvolněná granula z AP), K (Kupfferovy buňky), H (jaterní buňka), LSEC (jaterní sinusové endoteliální buňky), Ito (ito buňky), F (fenestra, póry), PC (pit buňky s NK na povrchu), disse (prostor obklopující buňky), Fialová kulatá buňka je neutrofil, červené buňky jsou erytrocyty (převzato a upraveno dle Preeti Kanika M. et al., 2021)*

KD reagují během několika minut po setkání s KD v játrech sinusoidů a poté vytvoří velkou embolii (obrázek 8). Nádorová embolie přilnula k jaterním sinusovým endoteliálním buňkám. Embolie byly agregované a degranulované KD, často byly spojeny s neutrofily

a s dalšími leukocyty, zatímco v blízkosti nedestičkvých nádorových buněk se nacházejí erytrocyty. Degranulované KD tvoří vnější zónu agregátů KD s těsně napěchovanou vnitřní zónou s aktivovanými KD obsahující usazeniny fibrinu. (Preeti Kanika M. et al., 2021)

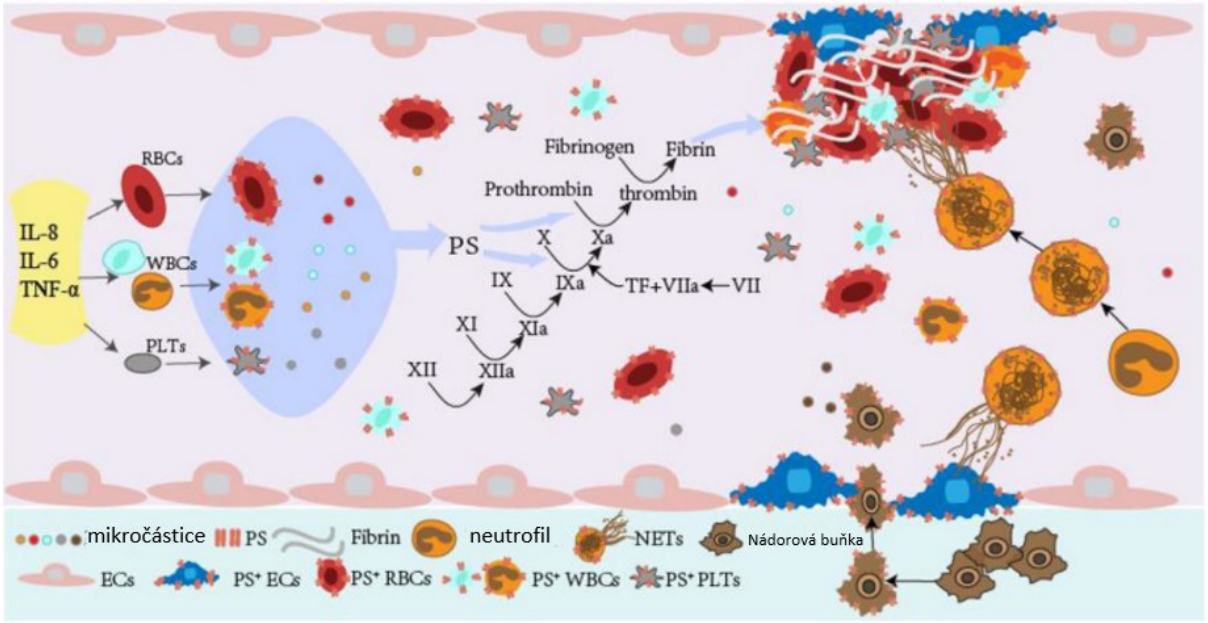


Obrázek 8 *Přichycení nádorové embolie k jaterní buňce: GR (uvolněná granula z aktivovaných KD), H (jaterní buňka), LSEC (jaterní sinusové endoteliální buňky), Ito (ito buňky), disse (prostor obklopující buňky), Fialová kulatá buňka je neutrofil, červené buňky jsou erytrocyty (převzato a upraveno dle Preeti Kanika M. et al., 2021)*

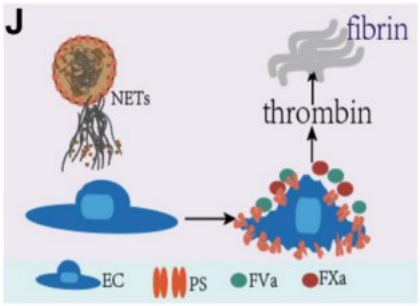
4.3 NET

Cirkulující krevní buňky doprovází často zánět, tam kde se nacházejí zvýšené hladiny IL-8, IL-6, TNF-α. IL-8 i IL-6 jsou spojovány se strukturálními změnami erytrocytů a KD, které přispívají k tvorbě trombu. IL-8, IL-6, TNF-α nabudí cirkulující krevní buňky a ty vypustí MPs (viz obrázek 9 a podrobněji v následující kapitole 4.4). Neutrofily jsou nejčastější formou zánětlivých imunitních buněk schopných uvolňovat z chromatinu složené extracelulární neutrofilní pasti (NET), které také obsahují granulované proteiny schopné podporovat VTE. NET jsou síťové struktury pomáhající zachytit KD a mají baktericidní funkci. NET jsou vychytáváním CTC schopny vyvolat u pacientů s nádorem poranění endoteliálních buněk, a to vede k vyšší propustnosti a dysfunkci. Vedou endoteliální buňky k tomu, aby se stáhly z buněčných spojů. Nádorové buňky vniknou dovnitř prostřednictvím těchto rozšířených spojení. Proto poškození endoteliálních buněk koreluje se zvýšenými intravaskulárními metastázami nádorových buněk (obrázek 9 i 10). NET také řídí expozici endoteliálních buněk PS a zvyšují související produkci FXa, protrombinu a fibrinu. PS je fosfolipid obvykle přítomný ve významném množství pouze na vnitřní straně buněčné membrány, přičemž k expozici na vnější membráně dochází pouze v určitých souvislostech,

například během aktivace buněk nebo apoptotické smrti. PS slouží jako vazebné místo pro koagulační faktory, a tím vede k tvorbě trombinu. (Muxin Y. et al., 2020)



Obrázek 9 *PS, mikročástice a NET podporují hyperkoagulabilitu a žilní trombózu v souvislosti s cirkulujícími krevními buňkami: Cirkulující buňky jsou nabuzeny IL-8, IL-6 a TNF-α a vypustí mikročástice (více o jejich navázání níže obrázky 12, 13 a 14) a z cirkulujících buněk se dostane na povrch PS. Nastane koagulační kaskáda (obrázek 10). Neutrofily začnou tvořit NET a to způsobí místní endoteliální poškození a adhezi buněk s PS, mikročástic a fibrinu a vzn. riziko pro tvorbu VTE. (převzato a upraveno dle Muxina Y. et al., 2020)*



Obrázek 10 *Působení NET na ECS: Z koagulační kaskády (viz 2.6) víme, že IXa tvoří tenázový komplex se svým kofaktorem VIIIa na povrchu buněčných membrán obsahujících fosfatidylserin (PS) za přítomnosti Ca^{2+}, které generují Xa. Proteáza Xa z buněčných membrán exprimujících PS se reverzibilně spojuje s kofaktorem Va za přítomnosti Ca^{2+} a tvoří protrombinázový komplex. Ten přeměňuje protrombin na serinproteázový trombin, což je jeho aktivovaná forma. Trombin je enzym přeměňující fibrinogen na nerozpustný fibrin a aktivuje KD. (převzato a upraveno dle A. Mitrugna et al., 2016, Muxina Y. et al., 2020)*

TVORBA NET

Jádra v izolovaných neutrofilech nabobtnají a ztratí svůj charakteristický lobulární tvar např. při výskytu phorbol-12-myristate-13-acetátu, lipopolysacharidu nebo IL-8. Následuje rozpad nukleární membrány a vypuzení chromatinu do cytosolu. NET jsou uvolněny jako struktury složené z DNA vláken lemovaných histony a granulovými proteiny, jako je elastáza neutrofilů a myeloperoxidáza. Nadměrná tvorba NET může být pro hostitele škodlivá tím, že zvyšuje trombózu. Druhým příkladem vzniku NET je vitální NETóza. Při NETóze tvoří NET

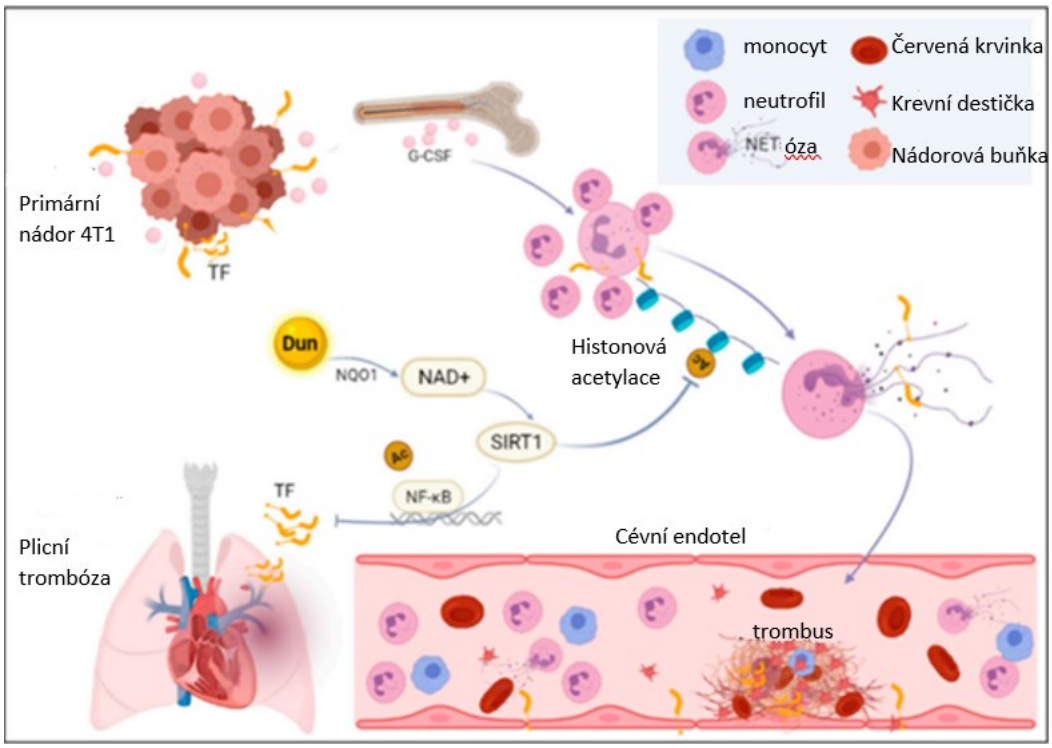
životaschopné neutrofily, které uvolňují jadernou DNA do extracelulárního prostoru, aniž by porušily molekulární signalizace určující volbu mezi fagocytózou, degranulací a uvolněním NET. Neutrofily prokazatelně uvolňují NET v reakci na patogeny příliš velké na to, aby je bylo možné pohltit, jako jsou nádory a velké bakteriální agregáty, ale nikoli v reakci na mikroby tak malé, aby mohly být fagocytovány, jako jsou kvasinky a jednotlivé bakterie. Tvorba NET může být regulována rozdíly v mikrobiální velikosti. NETóza nastává, když neutrofily uvolňují pavučinové struktury z granulovaných proteinů a dekondenzovaného chromatinu k zachycení a usmrcení patogenů, jako součástí vrozeného imunitního systému. (A. Mitrugno et al. 2016, Ch. Thålin et al., 2019, W. Cao et al., 2021)

Chromatinová dekondenzace nastává pomocí na vápníku závislém enzymu peptidyl-arginin deiminázy 4, který je členem skupiny pěti enzymů peptidyl-arginin deimináza 1- 4 a 6, ty zprostředkovávají posttranslační citrulinaci argininových zbytků na proteinech závislých na citrulinu. Peptidyl-arginin deimináza 4 je v nukleových a cytoplazmatických granulích imunitních buněk a zprostředkovaná citrulinace kladně nabitých zbytků jádra a linker histonů, oslabuje jejich interakci s DNA, čímž se rozvine pevně napěchovaný chromatin. Peptidyl-arginin deimináza 4 je nutná pro tvorbu NET. Citrulinované histony, jako například citrulinovaný histon H3, jsou proto považovány za biomarker pro tvorbu NET. (Ch. Thålin et al., 2019)

Rozkládání chromatinu bylo rovněž usnadněno tvorbou reaktivních forem kyslíku závislých na NAD(P)H oxidáze a následným štěpením histonů elastázou neutrofilů, která je závislá na myeloperoxidáze. Mitochondriální reaktivní forma kyslíku po imunitní stimulaci granulocytů pohání tvorbu NET a ty se obohatí o prozánětlivou oxidovanou mitochondriální DNA. Nádory vyvolávají histonovou hyperacetylaci neutrofilů, a to přispívá také k tvorbě NET (Obrázek 11). (Ch. Thålin et al., 2019)

NAD+ hraje důležitou roli v dráze a regulaci buněčných hladin NAD(P)H chinonoxidoreduktázy 1 (NQO1). NQO1 je antioxidační flavoproteinový enzym, který přeměňuje chinony na hydrochinony využitím NADH i NADPH jako dárců elektronů, čímž zvyšuje buněčné hladiny NAD+, což má cytoprotektivní účinky proti buněčnému poškození. Dunnion je perorálně podávaný substrát NQO1, díky kterému se urychluje oxidace NADH na NAD+ v mnoha tkáních. Porucha intracelulárních hladin NAD+ vede k mnoha onemocněním. NAD+ působí jako kofaktor enzymů na něm závislých včetně sirtuinů (SIRT). SIRT1 je protein a hraje zásadní roli v celé řadě biologických procesů prostřednictvím deacetylace histonů a dalších důležitých transkripčních procesů, jako je oprava poškozené DNA a faktorů, jako jsou jaderný faktor-kappa B (NF-κB) a p53. Dunnionem může NAD+ potlačit expresi

TF. Reguluje aktivitu NF-κB prostřednictvím osy NAD+/SIRT1/acetyl-NF-κB /TF a potlačuje tvorbu NET deacetylací a stabilizací neutrofilových histonů, a tím inhibuje koagulační kaskádu a zeslabuje tvorbu trombů u nádorových onemocnění. (W. Cao et al., 2021)



Obrázek 11 *Nádorové buňky a tvorba NET: Nádorové buňky zvyšují tvorbu NET podporou acetylace (Ac) histonů a aktivity neutrofilů (aktivované pomocí G-CSF= faktor stimulující kolonie granulocytů), které by mohli být zeslabeny dunnionem (substrát NQO1 dunion). 4T1 jsou buněčné linie karcinomu prsu a podávají se zvířatům k napodobení IV. stádia lidského karcinomu prsu pro nárůst cirkulujících neutrofilů při zjišťování plicní trombózy. Nedávno se NET objevili v plicní dysfunkci a TEN související s COVID-19. (převzato a upraveno dle W. Caa et al., 2021)*

NET podporují tvorbu trombinu tím, že poskytují povrch pro červené krvinky a prokoagulační molekuly, jako je vWF, fibronektin, fibrinogen, faktor XII, TF i prokoagulační EVs (extracelulární váčky), včetně EV nesoucích TF. Srážení fibrinogenu v přítomnosti komplexů histon-DNA má navíc za následek silnější fibrinová vlákna, vyšší stabilitu a odolnost fibrinového trombu i výrazně jeho prodlouženou dobu rozpadu. Podání deoxyribonukleázy 1 nebo použití peptidyl-arginin deiminázy 4 snižuje jak zužování cévy, tak aktivitu trombinu. (Ch. Thålin et al., 2019)

Z celé NET indukují tvorbu trombinu pouze DNA a histony. Aktivace koagulace DNA je zprostředkována FXII vnitřní dráhy. Histony navíc indukují expresi TF ve vaskulárních endoteliálních buňkách, makrofázích a monocytech, které by aktivovaly koagulaci vnější cestou. Histony také aktivují KD prostřednictvím toll-like receptorů 2 a 4 a posílení agregace KD náborem fibrinogenu. Aktivované KD pak indukují tvorbu NET pomocí mechanismů zahrnujících toll-like receptor 4 a P-selektin mají „zkřížený rozhovor“

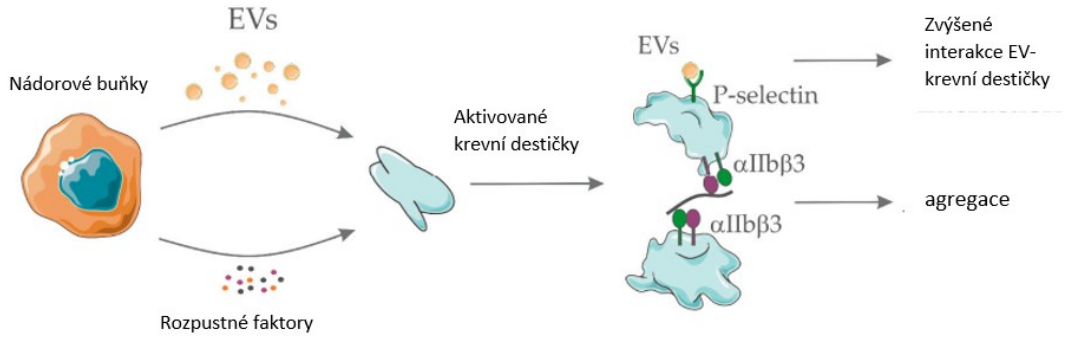
mezi KD a neutrofily při tvorbě NET. DNA bez buněk (cfDNA) vyvolává také tvorbu trombinu. Při léčbě rakoviny se její koncentrace v krvi zvyšují, a slouží jako biomarker pro diagnostiku nádoru. (A. Mitrugno et al., 2016, Ch. Thålin et al., 2019)

4.4 Mikrovezikuly

Existují tři typy vezikulů: extracelulární váčky (EV) – (mikročástice a exozomy) a apoptotická tělíska. Mikročástice (MPs) jsou malé membránové vezikuly, které se uvolňují z eukaryotických buněk po stimulaci, apoptóze nebo onkogenní transformaci. Tyto částice jsou složeny z aniontových fosfolipidů, včetně PS a fosfatidylethanolaminu, které představují dostatečný povrch pro iniciaci a podporu koagulace. (Muxin Y. et al., 2020)

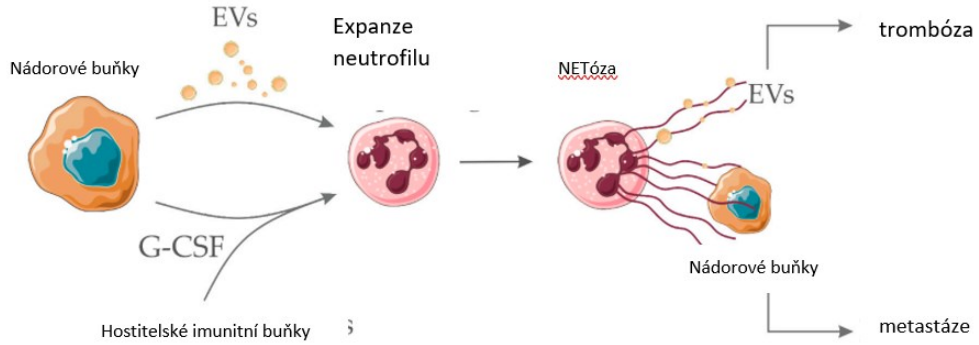
Částice také exprimují antigeny buněčného původu, cytokiny, matrix metaloproteinázy a obsahují messengerovou RNA a mikro RNA. Plazmatické MPs u zdravých pacientů se obecně získávají z cirkulujících krvinek, jako jsou KD, erytrocyty, leukocyty a endoteliální buňky. Tedy např. trombocytární MPs uvolněné po aktivaci KD pocházejí z plazmy. Dokážou urychlit tvorbu trombinu v plazmě bez KD. MPs podporují mezibuněčnou křížovou konverzaci během hematopoézy. Dnes je již dobře prokázáno, že TF z pozitivní nádorové MPs je spojován s protrombotickým stavem onkologických pacientů. MPs mohou exprimovat všechny molekuly podílející se na aktivaci a agregaci KD a na aktivaci koagulační kaskády. MPs dokázaly integrovat i s NET. Exozomy jsou menší puchýřky než MPs a liší se procesem tvorby a proteinovou expresí. Všechny EV jsou ohraničeny lipidovou dvojvrstvou a nemohou se replikovat. (V.H. Almeida et al., 2019, L. Plantureux et al.,2018)

Prohemostatické interakce mezi rozpustnými faktory/EVs odvozenými z nádorových buněk a KD znázorňuje obrázek 12. Prohemostatické interakce mezi rozpustnými faktory/EVs odvozenými z nádorových buněk a neutrofily znázorňuje obrázek 13. (V.H. Almeida et al., 2019)



Obrázek 12 *Prohemostatické interakce mezi rozpustnými faktory/EVs odvozenými z nádorových buněk a KD. Nádorové EV nebo z nádoru odvozené rozpustné faktory (jako je adenosindifosfát, tromboxan A2 a další) interagují s KD a podporují jejich aktivaci. Aktivace KD přispívá k expozici integrinu αIIbβ3 a další interakci s fibrinogenem, což umožňuje agregaci KD. Aktivace KD navíc podporuje expozici P-selektinu, který slouží jako ligand pro EV obsahující P-selektinový glykoprotein*

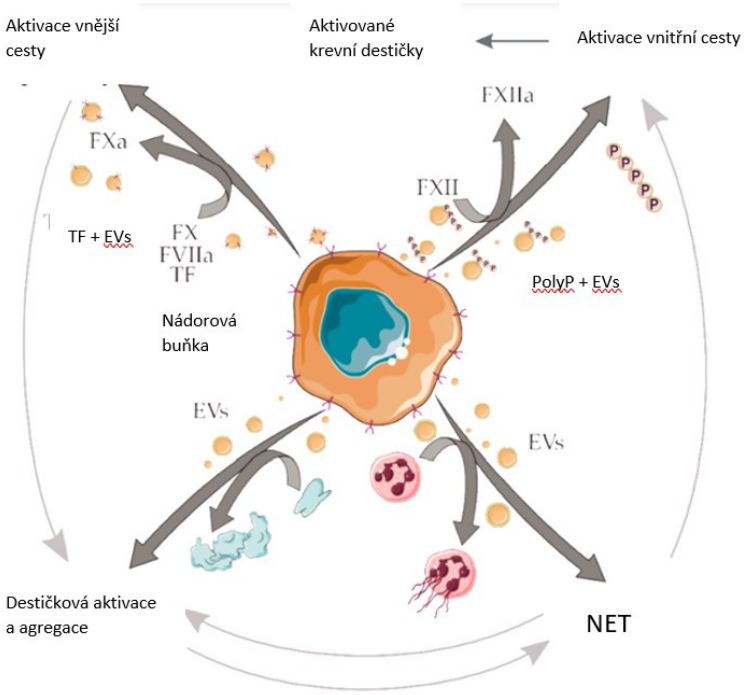
ligand 1 (PSGL1), jež se nachází na jejich membráně. EV interakce s KD upřednostňují jejich hromadění v místě trombotického poranění. Oba procesy společně upřednostňují tvorbu trombu (převzato a upraveno dle V.H. Almeidy et al., 2019)



Obrázek 13 *Prohemostatické interakce mezi rozpustnými faktory/EV odvozenými z nádorových buněk a neutrofily. EV odvozené z nádoru nebo rozpustné faktory odvozené z nádoru/hostitele, jako je faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) a další cytokiny, interagují s neutrofily a podporují proces tvorby NET. (převzato a upraveno dle V.H. Almeidy et al., 2019)*

Na obrázku 14 je vidět, že po aktivaci FXII byla spuštěna tvorba fibrinu negativně nabitými povrchy, jako jsou například polyfosfáty (polyP). FXIIa vede k aktivaci FXI a další reakce vyvrcholí tvorbou trombinu a fibrinogenové přeměně. KD mohou vylučovat prokoagulační polyP. Je to lineární polymer, který se přirozeně vyskytuje v různých délkových formách od několika fosfátových jednotek až po několik tisíc. Blokování polyP/FXII dráhy specifickou protilátkou, 3F7, poskytuje ochranu před TEN a zároveň nepodporuje krvácení. (V.H. Almeida et al., 2019)

U některých typů rakoviny může převažovat iniciace vnější dráhy koagulace TF+ EV nebo iniciace kontaktní dráhy polyP+ EV. EV odvozené z nádoru spolupracují s KD (podporující aktivaci KD a/nebo jejich agregaci) nebo s neutrofily (usnadňující uvolnění NET) pro stanovení protrombotických stavů. (V.H. Almeida et al., 2019)



Obrázek 14 *Možné propojení navrhovaných mechanismů EV odvozených z nádoru při trombóze spojené s nádorovým onemocněním: TF + EV iniciují vnější cestu koagulace. TF je receptor s vysokou afinitou pro koagulační faktor VII/VIIa, který aktivuje faktor X. Xa zase zprostředkovává proteolytickou konverzi protrombinu na trombin, serinovou proteázu, která zesiluje koagulační kaskádu a generuje fibrin, který stabilizuje KD zátku při tvorbě trombu. EV mohou vyvolat přímou aktivaci/agregaci KD. PolyP+ EV iniciují kontaktní dráhu koagulace, zprostředkovávající aktivaci faktoru XII negativně nabitými povrchy, které poskytuje polyP. Vrcholí tvorbou trombinu, přeměnou fibrinogenu na fibrin a aktivací KD. Interakce neutrofilů s EV odvozenými z nádoru může podporovat uvolňování NET, a tím vyvolat několik protrombotických mechanismů závislých na NET. (převzato a upraveno dle V.H. Almeidy et al., 2019)*

4.5 Fibrinolýza

Nádorové buňky mohou ovlivnit i proteiny fibrinolýzy, a to tak že exprimují fibrinolytické proteiny, jako jsou aktivátory plazminogenu, jejich inhibitory (inhibitor aktivátoru plazminogenu-1 a 2) a jejich receptory. Tkáňový aktivátor plazminogenu katalyzuje konverzi plazminogenu na plazmin. Ten degranuluje zesíťované fibrinové řetězce a produkuje řadu fibrinově štěpených produktů. Jedním z nich je například D-dimer, který vzniká během zesíťování fibrinu pomocí faktoru XIIIa. Plazmin je inhibován pomocí alfa-2-antiplasminu. (A. Falanga et al., 2017, W. E Winter et al., 2017)

5 Vyšetření pacienta

Nejprve je důležitá anamnéza daného pacienta a zjištění např. lokalizace trombu při neznámé etiologii předchozího onemocnění nebo u recidivy vyžadující dlouhodobou léčbu. Laboratorní vyšetření krve se doporučuje provádět v případě terapie u stavů, kde je možnost vzniku trombu. Především by se na toto vyšetření měly posílat těhotné ženy a popřípadě ženy, které začínají brát antikoncepci. Pro některé ženy by toto vyšetření mohlo být docela zásadní a mohly by tím předejít vzniku TEN. Důležitým faktorem, kdy by se nemělo opomíjet dělat laboratorní vyšetření, je oddělení onkologie, kde se nachází pacienti s nádorovým onemocněním. Zde je veliká pravděpodobnost vzniku TEN. Podle studií se během jednoho

roku až asi u 10 % pacientů s idiopatickou TEN zjistí maligní nádor. V běžné praxi se u pacientů s TEN převážně používá obvyklý screening, naopak ti pacienti s prokázaným maligním nádorem by měli být léčeni nízkomolekulárním heparinem, dokud je nádor aktivní. Obecně u pacientů se zjištěnou VTE by se měla nezávisle na klinických faktorech podávat antikoagulancia, a to nejméně po dobu tří měsíců. (N.J. Galioto et al., 2011)

5.1.1 Anamnéza

Anamnéza je prvním krokem u každého vyšetření pacienta nejen pro vyšetření TEN a nádoru. Pokud je to možné, měl by lékař klást otázky přímo pacientovi, aby zjistil pravou příčinu vniku nemoci. Jsou zde výjimky, u kterých to v nějakých případech není možné, např. malé děti či lidé mající se problém vyjadřovat. V takovýchto případech se lékař obrací na ošetřovatele či rodinného příslušníka, který bude moci tento stav pacienta a jeho příznaky přesně popsat. Za posouzení a vyhodnocení anamnézy zodpovídá sám lékař. (R. Malý a kol., 2011)

5.1.2 Pomocná vyšetření pacientů s PE

EKG u PE ukazuje fenomén S1Q3T3, to znamená, že vede ke vzniku změny úseku ST a vlny T (obrazu S1 Q3 s negativní vlnou T3) ve standardních svodech. Často vznikají negativní vlny T ve svodech, nebo se zablokuje pravé Tawarovo raménko. Inverze vln T v předsrdečních svodech je nejčastější abnormalita akutní PE, kterou lze nalézt u 68 % nemocných. Samotné EKG nestačí pro konečné vyšetření, je zde potřeba ještě udělat scintigrafii a angiografii plic. (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

Ventilační/perfuzní scintigrafie (V/Q scan) neboli scintigrafie plic patřila po dlouhou dobu k základním metodám sloužícím k diagnostice PE. Před skenováním V/Q je obvykle vyžadován normální rentgenový snímek hrudníku. Normální nález u perfuzní scintigrafie provedené v 4–6 projekcích do 24 hodin od nástupu symptomů spolehlivě vylučuje diagnózu PE. Výsledky plicního skenu jsou často klasifikovány do tří úrovní: normální sken (kromě PE), sken s vysokou pravděpodobností (u většiny pacientů považován za diagnostiku PE) a nediagnostický sken. Pozitivní prediktivní hodnota V/Q skenu s vysokou pravděpodobností však nestačí k potvrzení diagnózy PE u pacientů s nízkou klinickou pravděpodobností. Je potřeba dalších vyšetření například CT angiografie. (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

CT angiografie je zobrazovací metoda. Díky její zvyšující se přesnosti je důležitá v diagnostice PE. Touto metodou se posuzují všechny orgány uvnitř hrudníku, změny plicního parenchymu v souvislosti s embolizací (plicní infarkt a krvácení) a posouzení změn

pravé srdeční komory. Umožňuje také stanovení alternativní diagnózy v případech, kdy se o PE nejedná. Při vyšetření plicní cirkulace je možné posoudit i horní a dolní dutou žílu, pánevní žíly i hluboký žilní systém dolních končetin k odhalení zdroje embolizace. Tedy nám umožňuje vidět celý cévní systém. Jedinou nevýhodou tohoto vyšetření je radiační zátěž organizmu a musí se podat kontrastní látka. (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

Srdeční biomarkery (troponin a natriuretický peptid B) slouží k posouzení závažnosti, prognózy a míry agresivity terapie u akutní PE, zejména indikaci trombolýzy. Zvýšený natriuretický peptid B má jen omezený diagnostický význam u pacientů s podezřením na PE. Tlakové přetížení pravé komory v důsledku akutní PE je spojeno s větším natažením myokardu, který pak uvolňuje natriuretický peptid typu B. Troponiny jsou vysoce senzitivní markery poškození myokardu. Hladiny troponinu I a T v séru jsou v tomto případě příznivé prognosticky, ale ne diagnosticky. Jako markery dysfunkce pravé komory jsou hladiny troponinu zvýšené u 30 až 50 % pacientů se středně velkou až velkou PE a jsou spojeny s klinickým zhoršením a úmrtím po PE. (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

Echokardiografie se dělá především u pacientů, kteří nemají stabilní krevní oběh. Umožňuje rozpoznat dilataci pravé komory srdeční při hemodynamicky významné PE. Na základě systolického tlaku v plicnici, kde pozorujeme rychlost regurgitačního proudění na trikuspidální chlopni, lze kvantifikovat stupeň plicní hypertenze. Dilatace plicnice a vrcholová rychlost regurgitačního toku podporují diagnózu PE. Echokardiografie umožňuje vyloučit jiná kardiovaskulární onemocnění, např. napomáhá ve vyloučení akutního infarktu myokardu, disekujícího aneuryzmatu aorty, infekční endokarditidy, perikardiální tamponády a dalších stavů. Echokardiografii omezuje těžká obezita a plicní emfyzém. (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

Saturace kyslíkem

Existují tři klinicky založené prognostické modely pro pacienty s PE. Odlišujeme pacienty podle jejich nadmořské výšky, a tedy jejich normálních hodnot saturace vzduchu. U nás v ČR jsou normální hodnoty 95-98%, např. v horských oblastech je saturace kyslíku 98% a naopak čím níže se pohybujeme, tím více se saturace kyslíku snižuje. V Americe dělalo několik vědců výzkum, při kterém omezili pulzní oxymetrii na 94,5% saturace vzduchu v místnosti, aby měli úroveň moře a díky tomu rozlišili pacienty s PE na vysoce rizikové (< 95% saturace) a nízkorizikové (≥ 95% saturace) skupiny. Aujesky a kol. vytvořili validovaný index závažnosti PE, který hodnotí 11 faktorů (věk, pohlaví, rakovina, srdeční selhání, chronická obstrukční plicní nemoc, tepová frekvence ≥ 110 tepů/min, systolický

krevní tlak < 100 mm Hg, dechová frekvence ≥ 30 tepů/min, teplota < 36 °C, změněný duševní stav a pulzní oxymetrie < 90 %). Pro stratifikaci pacientů s PE se používá pět rizikových tříd s ohledem na 30-ti denní mortalitu. Třetí prognostický model," Geneva Risk Score", vyžaduje pro výpočet skóre arteriální krevní plyn a ultrazvuková data dolních končetin spolu s klinickými informacemi. Stratifikační modely indexu závažnosti PE i pulzní oxymetrie byly ověřeny jako cenné prediktory krátkodobé mortality. Tyto metody jsou lepší variantou pro hledání nemoci než nemonitorované terapie s použitím nízkomolekulárního heparinu, které neumožní včasnou identifikaci pacientů s nízkým rizikem krátkodobých nepříznivých následků. Při hledání konkrétních nemocí (PE, DVT…) a ověřování, jak na tom pacient je, slouží další metody, u kterých se na danou nemoc blíže zaměříme, např. biomarkery, echokardiografie, EKG, nebo jiné technologie, jako jsou CT, angiografie či ventilačně-perfuzní sken. (K. Nordenholz et al, 2012)

5.2 Laboratorní vyšetření

Transport vzorku musí být uspořádána tak, aby uspokojila tok vzorků z nemocničních oddělení i např. praktických lékařů, a zároveň sladila příjem vzorků s pracovním postupem v laboratoři. Vzorky se dopravují do laboratoře co nejrychleji, aby bylo možné včas změřit analyty ve stanovené době jejich stability a zajistila se tak jejich integrita. Kromě toho musí být samotný proces přepravy přísně kontrolován, aby bylo zajištěno, že požadované analýzy nejsou ovlivněny teplotou, mícháním nebo jinými fyzikálními nebo biologickými vlivy. Běžně se přepravují ručním vozíkem nebo ručně, ale stále větší počet nemocnic používá automatizované dopravní systémy, kterými mohou být pneumatické trubkové dopravní systémy nebo např. elektrické kolejové vozidlo. Externí vzorky jsou transportovány různými způsoby, např. autem, v boxech, pomocí dronů nebo i letadly a vlaky. Pokud jsou vzorky řádně chráněny před teplotními odchylkami a protřepáváním, žádná z těchto forem přepravy by vzorky neměla významně ovlivnit. (Mads Nybo et al., 2019)

5.2.1 Rutinní laboratorní vyšetření

Kompletní krevní obraz

Je jedním z nejčastějších krevních testů a často se provádí jako součást rutinní prohlídky. Tímto testem měříme různé parametry krve (včetně erytrocytů, leukocytů a KD) a sledujeme jejich hladiny. Pro zjištění trombů se především soustředíme na hladiny KD a podle nich lze určit, zda je porucha v nich anebo ve srážecích faktorech či kdekoliv jinde. Normální hodnota KD je 150 - 300 x 10^9/l, v případě zvýšené hladiny >300 x 10^9/l se tomu říká thrombocytóza a naopak, když je hladina snížená <150 x 10^9/l = thrombocytopenie.

U leukocytů je to 5-12 x 10^9/l v případě zvýšené hladiny >12 x 10^9/l = leukocytóza a naopak u snížených hladin <5 x 10^9/l = leukopenie (G-Ch. Wang et al., 2017, NHLBI, 2022)

Uchování vzorku: po odběru KD je lze uchovávat pouze 6 hodin oproti ostatním, kteří se skladují až 48 hodin. (D. Gunawardena, et al., 2017)

Testy srážlivosti krve neboli koagulační panel

Tyto koagulační testy měří dobu a jak dobře se krevní plazma sraží. Jedny z nejpoužívanějších testů jsou PT (protrombinový čas), APTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) a TT (trombinový čas). (Y. Zhao, et al., 2013)

Uchování vzorku: pro tyto tři testy je uchování při 15 - 25 °C po dobu 4 hodin optimální, při heparinové léčbě je stabilita plazmy pouze 1 hodina. Pokud je ale potřebujeme skladovat déle, tak vzorky pro TT a PT se mohou skladovat až po dobu 24 hod. buď při laboratorní teplotě, či při teplotě 4°C, obě tyto teploty jsou přijatelné. APTT se může skladovat ale pouze po dobu 8 hod., než se objeví nějaké změny, které znehodnotí vzorek. Stejné uchování vzorku jako TT a PT má například fibrinogen. I podtesty těchto všech testů mají stejné uchování. (Y. Zhao et al., 2013).

Test protrombinového času = Quickův test

PT měří vnější a společnou cestu koagulace. Tedy měří faktory VII, II (protrombin), V a X, a také se zaměřuje na fibrinogen. PT je rychlý test a při jeho detekci vidíme zákal. Referenční interval je obecně 10-13 s a liší se podle typu tromboplastinu. Komerční přípravky tromboplastinu jsou odvozeny z různých tkáňových zdrojů, včetně králičího mozku, směsí králičího mozku a plic, lidské placenty a zdrojů rekombinantní lidské tkáně. Tento test je doporučován lidem, kteří mají poruchu srážlivosti krve a berou léky na její ředění nebo jdou na operaci, aby se zjistilo, jak dobrou srážlivost krve mají, např. u nedostatku vitamínu K nebo při onemocnění jater. PT se běžně používá pro monitorování antikoagulační léčby warfarinem pro zjištění, zda neberou léku příliš mnoho, aby nezpůsobil nadměrné krvácení. (W. E Winter et al., 2017)

Díky různým typům tromboplastinu a přístrojů byl vyvinut mezinárodní normalizovaný poměr (INR). Relativní rozdíly v citlivosti komerčních tromboplastinových činidel jsou indikovány Mezinárodním indexem citlivosti (ISI). Světová zdravotnická organizace (WHO) má pro tromboplastin přidělený ISI 1,0.

Výpočet: $INR = (\text{PT pacienta v sekundách} / \text{průměrná normální PT v sekundách})^{ISI}$ (W. E Winter et al., 2017)

Příčiny prodloužení PT jsou kvůli nedostatkům, dysfunkcím nebo inhibicím faktorů VII, X, V, II nebo fibrinogenu, můžou selhávat játra, chybět vitamín K, diseminovaná intravaskulární koagulace = DIC, vysoké dávky heparinu atd. (W. E Winter et al., 2017)

Pro spousty pacientů je nepohodlné chodit tak moc často na kontroly do nemocnic na vyšetření PT, a proto se vytvořily přístroje pro domácí testování. Říká se jim domácí testovací jednotky PT/domácí testování INR (např. Coag-Sense Self-Test PT/INR Monitoring System, CoaguChek XS Plus a INRatio® 2 PT/INR Monitoring System). Tyto přístroje se tedy považují za lékařsky nezbytné a vydrží fungovat spousty let. Jsou určeny pro ty osoby, které vyžadují chronickou perorální antikoagulacii např. pro mechanickou srdeční chlopeň, komorový asistenční přístroj, chronickou fibrilaci síní, DVT, PE, žilní embolii nebo hyperkoagulační stavy (např. nedostatek antitrombinu III, Faktor V Leiden, nedostatek proteinu C a nedostatek proteinu S atd.). (AETNA, 2022)

Existují kritéria, která musí být splněna, než se dotyčný začne sám doma testovat na tomto přístroji: Předpokládaná potřeba domácího testování INR je 6 nebo více měsíců, osoba musí být před použitím domácích INR přístrojů antikoagulována alespoň 3 měsíce, samotestování přístrojem by nemělo probíhat častěji než jednou týdně, pacient musí před domácím použitím absolvovat edukační program o antikoagulační léčbě a prokázat správné používání přístroje. (AETNA, 2022)

Použití přístroje

Domácí testovací systémy PT jsou přenosné, bateriemi napájené přístroje pro kvantitativní stanovení PT z plné krve z prstu. Monitorovací zařízení měří dobu, po kterou se krev jednotlivce srazí. Kapka krve je získaná z kapiláry propíchnutím prstu pomocí lancety, nakápnuta na testovací proužek a analyzována přístrojem. Zařízení zobrazuje jak PT, tak vypočtený INR. Pokud jsou výsledky mimo normální rozmezí, je obvykle jedinci doporučeno provést test pro potvrzení znovu, a pokud výsledky zůstanou abnormální, musí se kontaktovat lékaře. Tato zařízení uchovávají 30–60 nejnovějších výsledků testů, které jsou označeny datem a časem. (AETNA, 2022)

Test PIVKA

Test PIVKA (proteiny indukované absencí nebo antagonismem vitaminu K) je nejužitečnější při diagnostice deficitu vitaminu K. Střední deficity koagulačních faktorů závislých na vitaminu K (II, VII, IX a X) způsobí abnormální výsledky testu PIVKA. Výsledek testu PIVKA se prodlouží 12 až 24 hodin po prodloužení PT. (R.B. Ford, E.M. Mazzaferro, 2012)

Test parciálního tromboplastinového času neboli aktivovaný parciální tromboplastinový čas

APTT je krevní test, který se používá k hodnocení vnitřních a společných cest koagulace. Používá se jako screeningový test na dědičné a získané deficity faktorů, ale také pro monitorování terapie nefrakciovaným heparinem. Na tento test se používá parciální tromboplastin, který nahrazuje fosfolipidy KD. Tato náhrada slouží k eliminaci variabilit způsobených změněným počtem nebo funkcí KD. (W. E Winter et al., 2017)

Výsledky testu APTT může ovlivnit několik léků např. heparin, warfarin, aspirin, vitamín C. Je dobré se napřed poradit s lékařem, zda tyto léky můžete brát i před testováním, anebo je raději vynechat a vzít si je až po testu. Tyto aspekty mohou zároveň i prodloužit APTT. Dále ho může prodloužit nedostatek, dysfunkce nebo inhibice prekalikreinu, vysokomolekulárního kininogenu, faktorů XII, XI, IX, VIII, X, V, II, DIC, hemofilie A nebo B, von Willebrandova choroba, hypofibrinogenemie (při níž je abnormální nedostatek fibrinogenu v cirkulující plazmě a dochází tedy k poruše srážení krve), antifosfolipidový syndrom. (W. E Winter et al., 2017)

APTT se udává v sekundách. Normální výsledky se pohybují obvykle mezi 25 až 35 sekundami. To znamená, že vzorku krve trvalo 25 až 35 sekund, než se po přidání chemikálií srazil. Referenční interval APTT se bude lišit podle typu instrumentace, antikoagulantu, typu zkumavky, typu činidla a šarže činidla. Tímto testem, ale nedokážeme diagnostikovat konkrétní stav, pouze pomáhá lékaři zjistit, zda jsou vaše faktory srážení krve dostatečné či nedostatečné. (W. E Winter et al., 2017)

Trombinový čas

Tímto testem se zjišťuje přeměna fibrinogenu na nerozpustný fibrin, která je způsobená působením trombinu, což je poslední krok v koagulační kaskádě. Tento děj se aktivně měří v krevní plazmě. Princip testu spočívá v tom, že se do citrátové plazmy přidá standardizovaná koncentrace trombinu a čas do vytvoření fibrinové sraženiny se zaznamená v sekundách. Referenční rozmezí závisí na použité koncentraci trombinu. Prodloužení tohoto testu je nedostatek fibrinogenu, abnormální struktura fibrinogenu nebo inhibice trombinu pomocí produktu degradace fibrinu či nefrakcionovanýmu heparinu. Nefrakcionovaný heparin ale není rutinně používán pro monitorování terapie. Lze jej použít pro kvalitativní hodnocení jeho přítomnosti v krvi, nebo při podezření na kontaminaci krevního vzorku heparinem, tj. při odběru krve. Nefrakcionovaný heparin, fondaparinux nebo přímé inhibitory faktoru Xa nemají žádný účinek na trombinový čas (TT), protože převážně nebo výhradně inhibují faktor Xa. (M.B. Mijovski, 2019)

Ale například přímé inhibitory trombinu, jako jsou bivalirudin, argatroban a dabigatran, ty značně TT prodlužují. Toto prodloužení se stává neměřitelným u většiny automatických koagulačních analyzátorů už i při nízkých koncentracích těchto inhibitorů trombinu. (M.B. Mijovski, 2019)

Nízké koncentrace fibrinogenu jsou způsobeny dědičným deficitem, sníženou produkcí v játrech nebo zvýšenou utilizací z DIC. Produkt degradace fibrinu se vytvoří díky plazminu, rozpustného (nezesíťovaného) fibrinu nebo nerozpustného (zesíťovaného) fibrinu. Zvýšené produkty degradace fibrinu svědčí pouze o aktivaci plasminu, protože mohou být produkovány rozkladem fibrinogenu bez přítomnosti trombu. (E. Javinsky, 2012)

Fibrinogenový test

Aktivace fibrinogenu trombinem vede k vytvoření účinné sraženiny. Testy fibrinogenu jsou užitečné pro diagnostiku hypofibrinogenemie, dysfibrinogenemie, DIC, primární fibrinolýzy a dalších klinických stavů. K dispozici je několik testů fibrinogenu, včetně gravimetrických, imunologických (na bázi antigenu), optických a funkčních testů. (W. E Winter et al., 2017)

Claussův test je nejběžněji prováděný fibrinogenový test a je modifikovaným TT. Test používá zředěnou plazmu. Doba potřebná k vytvoření sraženiny se porovná s referenční plazmatickou kalibrační křivkou pro odvození koncentrace fibrinogenu (např. mg/dl) testovaného vzorku. Většina laboratoří používá jako prostředek detekce sraženiny automatizovanou metodu, ve které optická hustota směsi překračuje stanovený práh. (W. E Winter et al., 2017)

Imunologické hmotnostní testy jsou založeny na enzymatickém imunoabsorbantu (ELISA), radiální imunodifuzi a elektroforézních technikách. Imunologické testy měří koncentraci proteinu (antigenu) spíše než funkční aktivitu. Nesoulad mezi aktivitou fibrinogenu a hladinou antigenu je charakteristický pro dysfibrinogenemie. (W. E Winter et al., 2017)

Gravimetrické testy se provádějí přidáním trombinu a vápníku k naředění plazmy pacienta. Výsledná sraženina se stlačí za účelem vytlačení plazmy a nepoužitého činidla, vysuší a zváží. Tento test je technicky obtížný. (W. E Winter et al., 2017)

Funkční turbidimetrický test fibrinogenu

6% albumin ve funkčním turbidimetrickém testu fibrinogenu odstraňuje falešně zvýšený zákal fibrinogenu při přeměně na fibrin ve vzorcích hypoproteinemické plazmy. Tento test může detekovat aktivitu fibrinogenu od 250 % do 300 % normálních

hodnot, přičemž spodní mez detekce je 7 % normální hodnoty (0,2 g/l). Tento test napodobuje konverzi fibrinogenu na fibrin ve srážející se krevní plazmě, je nezávislý na plazmatickém albuminu nebo heparinu a lze jej provádět všude. Tento test má diagnostickou hodnotu při patologické DIC a při hodnocení rizika aterotrombózy. (T.W. Stief, leden 2008)

Reptilázový test

Doba reptilázy je podobná TT s tím rozdílem, že k aktivaci koagulační kaskády se používá hadí jed. Hadí jed z jihoamerické zmije obsahuje reptilázu, enzym, který je svou povahou podobný trombinu a hydrolyzuje fibrinopeptid A z neporušených molekul fibrinogenu na rozdíl od trombinu, který štěpí fibrinopeptidy A a B z fibrinogenu. Vzniklá sraženina je slabší než sraženina vzniklá působením trombinu na fibrinogen. Referenční hodnoty pro zdravé dospělé jsou 18-22 s. U zdravých novorozenců může být doba plazmatu mírně prodloužena až na 24s. Výhodou reptilázového času je, že není ovlivněn přítomností heparinu a je minimálně ovlivněn produkty degradace fibrinu. Reptilasový čas je užitečný ve srovnání s TT pro daného pacienta k detekci přítomnosti inhibitorů trombinu. (W. E Winter et al., 2017, H. Karapetian, 2013)

Ekarinový srážecí čas

Tento test využívá hadí jed k produkci trombinového zprostředkovatele, meizotrombinu. Ten je inhibován přímými inhibitory trombinu, a tedy umožňuje jeho měření. Pro tento účel je užitečnější než APTT. Problém je s omezenou dostupností mimo výzkumné účely a komerční kity nejsou validovány ani standardizovány. (J.D. Vanderwerf et al., 2017)

Ekarinový chromogenní test

Stejně jako ekarinový srážecí čas používá ekarinem indukovanou aktivaci protrombinu, ale místo měření srážení meizotrombinu se měří změny v optické hustotě indukované aktivitou vůči chromogennímu substrátu. Je citlivější než ekarinový srážecí čas pro detekci účinků přímých inhibitorů trombinu. (J.D. Vanderwerf et al., 2017)

Anti-Xa test

Tímto testem lze přímo hodnotit chromogenním postupem aktivitu heparinu v plazmě. Obecně reakční směs obsahuje exogenní Xa a také chromogenní substrát pro Xa. Některé verze testu využívají pacientovy vlastní antitrombiny, zatímco jiné doplňují exogenní antitrombiny. Bez ohledu na to u obou metod tvoří heparin přítomný ve vzorku komplexy s antitrombinem a tento komplex inhibuje Xa. Jakýkoli zbytkový Xa štěpí syntetický chromogenní substrát a uvolňuje žlutě zbarvený chromofor (p-nitroanilin), který se odečítá opticky při 405 nm. Množství uvolněného chromoforu je nepřímo úměrné koncentraci

přítomného heparinu. Test může být automatizován a může být použit k měření jak nefrakcionovaného heparinu, tak heparinu s nízkou molekulovou hmotností. Anti-Xa testy jsou dražší než APTT a nejsou dostupné ve všech nemocnicích. Anti-Xa test může být nespolehlivý pro monitorování nefrakcionovaného heparinu u pacientů, kteří přecházejí z nízkomolekulárních heparinů, fondaparinuxu nebo perorálního inhibitoru faktoru Xa (apixaban, betrixaban, edoxaban, rivaroxaban) na intravenózní nefrakcionovaný heparin. V takových podmínkách by léčba nefrakcionovaným heparinem měla být monitorována APTT. (W. E Winter et al., 2017, E.H. Centeno et al., 2019)

Uchování vzorků: Vzorky musí být zpracovány do 1 hodiny, aby nedošlo k neutralizaci heparinu. Vzorky musí být čisté. Hemolyzované nebo neprůhledné vzorky nelze zpracovat, protože mohou způsobit falešně nízké hladiny. (E.H. Centeno et al., 2019)

Test D-dimerů

Test hledá konečné rozpadové produkty fibrinu, jež se nazývají D-dimery. Vznikají následkem působení plazminu na vláknitý fibrin během fibrinolýzy. Jejich zvýšené hodnoty (do 250 μg/l) nacházíme u DVT a PE, ale i u mnoha dalších onemocnění (záněty, nekrózy, nádorová onemocnění). Ve srovnání s běžnou populací u onkologických pacientů se nachází několikanásobně zvýšené množství falešně pozitivních výsledků. D-dimery slouží zejména k vyloučení PE a žilní trombózy. Když je pozitivní prediktivní hodnota zvýšených hladin D-dimerů nízká, tak to PE nepotvrdí. U onkologických pacientů není vyšetření D-dimerů rutinně doporučeno, protože i při negativním výsledku bychom měli ve vyšetřovacím algoritmu pokračovat. (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

Mezi další stavy, které mohou způsobit vysoké hladiny D-dimerů, patří např. těhotenství , srdeční onemocnění anebo i nedávná operace. Pokud výsledky D-dimeru nebyly normální, je třeba počítat s dalšími testy k určení přesné diagnózy. Nejčastěji se pacientu posílají na doplňující testy: EKG, ventilačně-perfuzní (V/Q) sken, CT angiografie, srdeční biomarkery, skiagram hrudníku, echokardiografie (B. Kadlec a kol., 2010, V. Vyas et al., 2022)

Uchování vzorku: Stabilita D-dimeru v plazmě před zmrazením je po dobu až 4 hodin při teplotě v místnosti, až 24 hodin při teplotě +2 až +8 °C a při teplotě ≤-60 °C se v plazmě dá skladovat až po dobu tří let. (M. Böhm-Weigert et al, 2010)

C-reaktivní protein

CRP je členem rodiny pentraxinových proteinů přirozené imunitní odpovědi. Je syntetizován játry v reakci na interleukin-6, je také produkován v buňkách hladkého svalstva v lidských koronárních arteriích a je exprimován přednostně v nemocných cévách. Jeho

vyšetření a stanovení hodnot je široce dostupné, jednoduché, rychlé a relativně levné. Stanovuje se především jako biomarker zánětu a kardiovaskulárního rizika. Ale přesto to není jen specifický marker infekčního (bakteriálního) onemocnění. Ke zvýšení hodnot CRP totiž dochází i při jakémkoli neinfekčním zánětu (např. autoimunitním nebo nádorovém onemocnění) a při tkáňové nekróze (ischémii, embolii, po operačním výkonu). Jeho hodnota přímo koreluje s rozsahem tkáňového poškození. Ačkoli jsou takové testy automatizované a reprodukovatelné, mají spodní detekční limit 3 až 8 mg/l, a proto nejsou dostatečně citlivé, aby detekovaly nízké variace požadované pro predikci vaskulárního rizika. Pro zlepšení citlivosti testů CRP došlo k zesílení vlastností komplexu antigen-protilátka pro rozptyl světla kovalentním spojením latexových částic se specifickou protilátkou a těmto testům se začalo říkat hsCRP (Vysoce citlivý C-reaktivní protein). (P. Polák a kol, 2016, S.S. Bassuk et al., 2004)

Měření hsCRP poskytuje prognostickou hodnotu a doplňuje hodnocení při všech hladinách cholesterolu, závažnosti metabolického syndromu a krevním tlaku a u pacientů se subklinickou aterosklerózou i bez ní. Hladiny hsCRP nižší než 1, 1 až 3 a vyšší než 3 mg/l jsou spojeny s nižším, středním a vyšším kardiovaskulárním rizikem. Screening hsCRP by bylo dobré dělat souběžně s hodnocením cholesterolu, aby se usnadnilo použití společných výsledků pro hodnocení globálního rizika. Zvýšený hsCRP je spojen se zvýšenou hustotou makrofágů v plaku, vyšší prevalencí ateromů s tenkým uzávěrem a zvýšeným rizikem eroze a ruptury plaku. (S.S. Bassuk et al., 2004)

HsCRP také souvisí se specifickými patologickými typy rakoviny. Adenokarcinom byl pozitivně spojen s hsCRP na rozdíl od spinocelulárního karcinomu, kde nebyla žádná významná souvislost. Zdraví jedinci mající zvýšené hodnoty hsCRP mohou mít v budoucnosti předpoklady, že se u nich vyvine riziko nádorového onemocnění. Tento test lze provést bez ohledu na stav nalačno nebo denní dobu. (P. Polák a kol, 2016, S.S. Bassuk et al., 2004, J. Epidemiol, 2011)

Uchování vzorku: Díky své pentraxinové struktuře má hsCRP dlouhý plazmatický poločas 18 až 20 hodin, což umožňuje přesné měření v čerstvé nebo zmrazené krvi bez nutnosti speciálních odběrových postupů. CRP je stabilní při 4 °C po dobu 60 dnů, při -70 °C po dobu delší než 20 let a v kapalném dusíku po neomezenou dobu. (S.S. Bassuk et al., 2004)

5.2.2 Výzkum potenciálních biomarkerů

Citrulinovaný histon H3

Koncentrace citrulinovaného histonu H3 v séru se dá měřit pomocí soupravy ELISA. Tento test využívá monoklonální protilátku specifickou pro histon H3. Spodní limit detekce testu byl na 0,1 ng/ml a horní 31 ng/ml. Tento použitý test histonu H3 ELISOU je jednoduchý, ale relativně nový, proto může vyžadovat další validaci, než bude zaveden jako spolehlivý test pro rozsáhlé použití v praxi. (P. Kuczia et al., 2020)

Hladiny citrulinovaného histonu H3, myeloperoxidázy a neutrofilní elastázy se dají také měřit pomocí imunohistochemie. Dále také průtokovou cytometrií, zde se vyšetřují pozitivní neutrofily na tento histon v periferní krvi. Tyto poznatky ukazují, že citrulinovaný histon H3 je užitečný biomarker pro včasnou detekci NETózy. NET totiž hrají klíčovou roli v obraně hostitele, ale nadbytek a prodloužená interakce NET s KD může způsobit závažný zánět a poškození hostitelského orgánu. Modifikace histonu H3 citrulinací se účastní tvorby NET. (K. Nomura et al., 2019)

Uchování vzorku: Prozatím se citrulinovaný histon H3 používá pouze pro experimentální výzkumy a před zpravováním se vzorky mrazí do -80°C. Současný výzkum brzdí nedostatek standardizovaných testů. (Ch. Thålin et al., 2020)

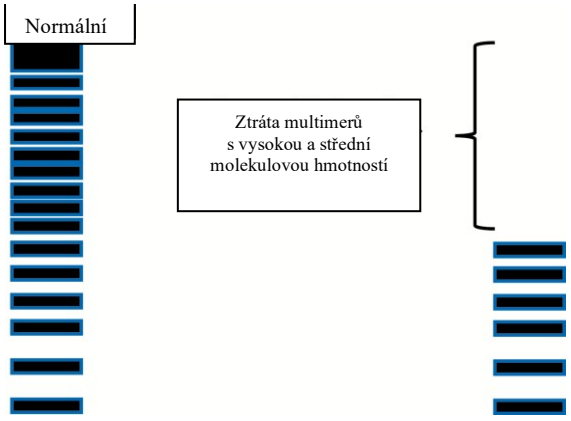
VWF

Např. na zjištění von Willebrandovy choroby, u které dochází k defektní syntéze nebo uvolňování funkčního VWF se používá imunoturbidimetrie. Tento stav může být spojen se sníženou antigenní a funkční aktivitou nebo s relativně normální koncentrací antigenu při snížené funkční aktivitě. Touto technikou může většina koagulačních laboratoří měřit plazmatickou koncentraci proteinu VWF (antigen VWF). (W. E Winter et al., 2017)

Uchování vzorku: vzorek by se měl zpracovat do 4 hod. po odběru. (G. Becs et al., 2016)

Testování funkční aktivity VWF využívá lék ristocetin, který usnadňuje interakci receptoru na KD a ligandu (VWF) v této aglutinační reakci. Aktivita VWF se z pacientovy plazmy (zdroj VWF) stanovuje v kombinaci s lyofilizovanými KD fixovanými ve formalínu (zdroj receptoru) a ristocetinem. Tento první postup se nazývá aktivita kofaktoru ristocetinu. Druhý je ristocetinem indukovaná agregace KD, která využívá živé KD a plazmu pacienta. (W. E Winter et al., 2017)

Stav **multimerizace VWF** je důležitý a je hodnocen **elektroforézou na agarózových gelech** (viz obrázek 15). Normální plazma produkuje rozšířený „žebřík“ multimerů včetně forem s vysokou molekulovou hmotností. Typ 2A a 2B von Willebrandovy choroby je spojen s nedostatkem multimerů se střední a vysokou molekulovou hmotností. (W. E Winter et al., 2017)



Obrázek 15 *Multimerizace VWF elektroforézou: Distribuce multimerů VWF je hodnocena elektroforézou na agarózovém gelu, která odděluje multimery podle jejich molekulové hmotnosti, přičemž větší multimery jsou v horní části obrázku. Western blot vpravo představuje ztrátu těch multimerů, které jsou nezbytné pro normální funkci VWF. (převzato a upraveno dle W. E Wintera et al., 2017)*

Uchování vzorku: při odebrání vzorku plazmy z krve se používají zkumavky s citrátem. Vzorky se analyzují přímo nebo se skladují při – 80°C. (I. Skornova et al., 2021)

CLEC-2 a podoplanin

Před snídaní je odebrána periferní krev do vakuových zkumavek. Centrifugována při 1500 g po dobu 15 minut. Koncentrace podoplaninu a CLEC-2 se měří za použití komerčně dostupných souprav ELISA (enzymem vázaný imunosorbentní test neboli enzymová imunoanalýza). (M. S. Tabatabaei et al., 2022, Ying J. et al., 2022)

Při testu ELISY u podoplaninu se do zkumavky přidává EDTA. Intenzita zbarvení se měří při vlnové délce 450 nm. Podoplanin lze také zjistit pomocí dalších metod, jako jsou imunohistochemie, testy migrace a invaze, kde se výsledky poté pozorují pod mikroskopem atd. (K. Takiguchi et al., 2022)

Antikoagulační látky jako je EDTA, citráty atd. mají zanedbatelné účinky na rozpustný CLEC-2 při ELISE. Proto se vzorky krve odebírají standardními postupy při rutinních testech. Absorbance se měří během 30 minut při 450 nm a po excitaci při 630 nm. (Hiroyasu I. et al., 2022)

Uchování vzorku: Pokud se supernatanty hned nepoužijí, tak se skladují při -80 °C až do testování. (M.S. Tabatabaei et al., 2022)

Průtoková cytometrie pro detekci P-selektinu a dalších látek

Exprese povrchového P-selektinu KD a heterotypických agregátů leukocytů a KD se měří průtokovou cytometrií. Pro standardizaci podmínek měření a pro minimalizaci in vitro aktivace KD se plná krev fixuje pro měření P-selektinu a značí se pro stanovení heterotypických agregátů do 2 hodin po odběru krve. Vzorky plné krve se pro detekci heterotypických agregátů leukocytů a KD inkubují s CD14-PE a CD42a-FITC po dobu 15 minut. Výsledky se vždy porovnávají se vzorky obarvenými neimunitním IgG, které slouží jako izotypové kontroly. (G. Becs et al., 2016)

Uchování vzorku: vzorek by se měl zpracovat do 4 hod. po odběru. (G. Becs et al., 2016)

Imunohistochemické vyšetření PTEN a p53

Tyto 2 geny lze například stanovit imunoexpresí. Pro stanovení PTEN se používají myší monoklonální protilátky a pro stanovení p53 se používají králičí polyklonální, přičemž se tyto protilátky cytoplazmaticky barví. (L. Vermij et al., 2022)

„Divoký typ“ p53 má krátký poločas a nelze jej imunohistochemicky detekovat. U zmutování p53 dojde ke zvýšení stability, což umožňuje u imunohistochemie nepřímo hodnotit funkce p53. Mutantní p53 může získat onkogenní funkce. (L. Vermij et al., 2022)

Sklíčka se pro imunohistochemické vyšetření kontrastně obarví Harrisovým hematoxylinem, dehydratují a překryjí krycím sklíčkem, poté je můžeme pozorovat. Kontrolní sklíčka se inkubují s myší nebo králičí univerzální negativní kontrolní protilátkou, s kroky barvení a inkubační dobou identickou, jako se vzorkem. (L. Vermij et al., 2022)

Uchování vzorku: před zpracováním vzorku se materiál fixuje v 10% formalínu po dobu 24-72 hod. (D. S. Russell et al., 2018)

PTEN a p53 z krve

Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce

Používají se vzorky periferní krve pro extrakci genomové DNA od pacientů s nádorem. Extrahuje se mRNA ze vzorku. Pro amplifikaci p53 a PTEN complementární DNA se provede PCR (polymerázové řetězové reakce). Produkty PCR se separují elektroforézou na 1% agarózovém gelu a vyříznuté pásy DNA se purifikují. (Hideaki K. et al., 2000)

Imunoblotting

Lze purifikovat PTEN označením pomocí histidinu. Gen PTEN je frakciován pomocí sodné elektroforézy na dodecylsulfát-polyakrylamidovém gelu a poté elektroforeticky

přenesen na filtr, kde se detekuje pomocí monoklonální protilátky. Zde se rozpoznávají aminokyseliny v počtu 388–400 lidského PTEN a poté je gen vizualizován pomocí vylepšené chemiluminiscenční sady. (Hideaki K. et al., 2000)

Analýza mutace a ztráty heterozygotnosti PTEN

Genomová DNA se extrahuje z nádorových tkání a párových lymfocytů periferní krve. Používají se tři vysoce polymorfní mikrosatelitní markery lemující gen PTEN (D10S579, D10S215 a D10S541). Pomocí nich se stanovují alelické nerovnováhy lokusu PTEN (10q23). Vyšetření se provádí metodou PCR. (Hideaki K. et al., 2000)

Uchování vzorku: Všechny vzorky se po resekci rychle nechají zmrazit v kapalném dusíku a uchovávají se zmrazené při -80 °C až do doby, kdy bude potřeba extrakce nukleové kyseliny. (Hideaki K. et al., 2000)

Bezbuněčná DNA

Bezbuněčná DNA (cfDNA) nacházející se v krevním řečišti je primárně vedlejším produktem buněčné smrti v normálních i rakovinných buňkách. Cirkulující fragmenty DNA jsou převážně krátké molekuly s průměrnou délkou o velikosti mononukleozomů, které mají tendenci být více fragmentovány v internukleozomálních linkerech a otevřených oblastech chromatinu. To vede ke zkreslenému, nenáhodnému fragmentačnímu vzoru. Navíc fragmenty DNA derivované z tumoru bývají kratší než frakce derivovaná z nenádorových buněk a neustále se hromadící důkazy naznačují, že fragmentace cfDNA může sloužit jako biomarker rakoviny na úrovni celého genomu. (Y V. Zhitnyuk et al., 2022)

K přesné analýze koncových profilů cfDNA fragmentů v genomových oblastech různých druhů rakovin se používá modifikovaný přístup ukotvené multiplexní PCR následované sekvenováním nové generace (např. hledání somatické mutace atd.). Ligace univerzálního adaptéru na cfDNA je následována prodloužením primeru z mnoha cílových primerů tak, aby výsledné produkty obsahovaly sekvence univerzálního adaptéru na 3'-koncích. Ligované adaptéry obsahují jedinečné molekulární identifikátory, které účinně odstraňují duplikáty PCR během následné analýzy a konvergují počty čtení k počtu původních molekul cfDNA. Toto schéma umožňuje cílenou amplifikaci při zachování informace o původních koncových souřadnicích fragmentů cfDNA. (Y. V. Zhitnyuk et al., 2022)

Uchování vzorku: uchovávat vzorek lze maximálně 2 týdny, ale zpracování do týdne či méně je vhodnější z důvodu minimalizování kontaminace. (S. Volik et al., 2016)

6 Závěr

Nejčastější nemoc, která zastupuje tromboembolie je žilní tromboembolismus, tvořený ze dvou nemocí. První z nich je hluboká žilní trombóza, poté je plicní embolie. Tato onemocnění jsou poměrně častá, a přesto byla popsána teprve v nedávné době. V 19. století byl i popsán první případ, kde byla zdokumentovaná žilní trombóza u pacienta s rakovinou. Armand Trousseau si sám u sebe diagnostikoval migrační povrchovou tromboflebitidu u levé horní končetiny a zároveň měl rakovinu žaludku, později na tuto nemoc zemřel. Díky jeho výzkumům se syndrom spojující migrující tromboflebitidu a nádorové onemocnění, jmenuje se po něm Trousseauův.

U Interních pacientů se nejčastěji projevuje tromboembolie u imobilizačního syndromu, kde jsou pacienti upoutáni na lůžko po delší dobu. Dále se u nich mohou projevit např. flembotrombóza, tromboflebitida, křečové žíly či aterotrombóza. Při aterotrombóze se aktivně účastní CRP. Za normálních podmínek je CRP pentamer, ale prostřednictvím lyzofosfatidylcholinu se přemění na monomerní CRP. Monomerní CRP se detekuje při klinických vyšetřeních. Při aterogenezi se totiž hromadí a může vyvolat lokální zánět. Při zánětu působí i NET z neutrofilů.

U nádorů se nádorové buňky putující v krevním řečišti musí bránit proti náročnému mikroprostředí, smykovým silám či cytotoxickým NK buňkám. Proto okolo sebe vytváří plášť, v podobě mikroembolie bohaté na KD a fibrin, a tím se maskují a mohou přežít a uniknout imunitnímu systému. Prostřednictvím svých různých faktorů mohou aktivovat systém krevního srážení a další děje, které pomáhají tvořit trombus, a tedy může vznikat tromboembolie. Nádorové trombózy se účastní prokoagulační proteiny, mikročástice, proangiogenní a růstově stimulační faktory a zánětlivý cytokiny.

Některé nádorové buňky k aktivaci KD používají spojení CLEC-2-podoplanin. V tomto případě se podoplanin nachází na nádorových buňkách a CLEC-2 na povrchu KD. Vážou se na sebe prostřednictvím 2 domén PLAG3 a 4, jež se nacházejí na podoplaninu a mají O-glykosylační místa, které přitahují CLEC-2. Podoplanin má i další funkce než jen připojit KD k nádorové buňce. Jeho další část se váže na protein ERM, který působí spolu s dalšími složkami na nádorové buňce a pomáhá buněčné migraci, motilitě, invazím ke vzdáleným orgánům atd. Proto jsou podoplanin a CLEC-2 dobrými potencionálními biomarkery.

Zánět je součástí procesu vytváření trombu a nacházejí se při něm zvýšené hladiny cytokinů (IL-8, IL-6, TNF-α). Tyto cytokiny jsou schopné nabudit cirkulující krevní buňky, aby vypustily mikrovezikuly. Ty poskytují povrch pro iniciaci a podporu koagulace. Jsou

schopné interagovat s rozpustnými faktory z nádorových buněk, s NET atd. a podporovat tak mezibuněčnou křížovou konverzaci během hematopoézy. Dále při zánětu působí neutrofily, které jsou schopné uvolňovat tyto NET. NET mají baktericidní funkci a objevují se, když je potřeba odstranit vetší patogenní buňku, která nemůže být fagocytována. Dále také pomáhají zachytit KD, vedou endoteliální buňky ke stáhnutí ze svých buněčných spojů, a tak zajišťují lepší průchod mezi nimi. Díky této jejich funkci mohou nádorové buňky snáze metastazovat. Při dekondenzaci chromatinu a vypuštění NET probíhá citrulinace histonů, a proto se mohou považovat za dobrý biomarker (citrulinovaný histon H3) pro zjištění NET.

Seznam literatury:

1) J.P. Galanaud et al. „*The history and historical treatments of deep vein thrombosis“* vol 11., no 3, pp 402-411, 2013, DOI: 10.1111/jth.12127

2) J. Bauer *„Antikoagulační terapie v prevenci a léčbě ischemických iktů“* vol 73/106., no 5, pp480-491, 2010, https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2010-5/antikoagulacni-terapie-v-prevenci-a-lecbe-ischemickych-iktu-33940/download?hl=cs

3) P.M. Mannucci *„Venous thrombosis: the history of knowledge“* vol 32., no 1, pp 209-212, 2002, https://www.karger.com/Article/PDF/73567

4) R. Beasley et al. *„eThrombosis: the 21st Century variant of venous thromboembolism associated with immobility“* vol 21., no 2, pp 374-376, 2003, DOI: 10.1183/09031936.03.00039403

5) P.J. Gaffney *„D-dimer. History of the Discovery, Characterisation and Utility of this and other Fibrin Fragments“* vol 7, no 2, pp 2-8, 1993, DOI: 10.1016/0268-9499(93)90039-X

6) J. Rogers et al. *„Armand Trousseau“* vol 2., no 1, pp 854, 3.listopadu 2020, https://litfl.com/armand-trousseau/

7) S. Ikushima et al. *„Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis“* vol 46., no 3, pp 204-208, 2016, DOI: 10.1093/jjco/hyv165

8) A D. Da Gama *„The unknown history of heparin's Discovery“* vol 15., no 1, pp 25-30, leden - březen 2008, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18618048/

9) J. Arnout et al. *„Haemostasis“* vol 176., no 2, pp 1-41, 2006, DOI: 10.1007/3-540-36028-x_1

10) J. Thachil *„Deep vein thrombosis“* vol 19., no 5, pp 309-310, 2014, DOI: doi.org/10.1179/1024533214Z.000000000284

11) E. Campello et al. *„Trombophilia, risk factors and prevention“* vol 12., no 3, pp 147-158, 2019, DOI: doi.org/10.1080/17474086.2019.1583555

12) A.M. Wendelboe et al. *„Global public awareness of venous thromboembolism“* vol 13., no 8, pp 1365-1371, 18. června 2015, DOI: 10.1111/jth.13031

13) D. Musil *„Rizika a prevence tromboembolické choroby“* vol 6, no 2, pp 61-65, 2009, https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/02/02.pdf

14) E.M. Van Cott et al. *„Faktor V Leiden“* vol 91., no 1, pp 46-49, 2015, DOI: doi.org/10.1002/ajh.24222

15) S. Elkattawy et al. *„Prothrombin G20210A Gene Mutation-Induced Recurrent Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: Case Report and Literature Review“* vol 10., no 1, pp 1, 2022, DOI: doi.org/10.1177/23247096211058486

16) M.A. Escobar *„Less Common Congenital Disorders of Hemostasis“* vol 4., no 1, pp 59-79, 2019, DOI: 10.1016/B978-0-323-46202-0.00004-2

17) S. Mohammed et al. *„Laboratory Testing for Activated Protein C Resistance (APCR)“* vol 1646., no 10, pp 137-144, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-7196-1_10

18) F.R.T. Nelson et al. *„Musculoskeletal Diseases and Related Terms“* vol 8., no 1, pp 1-505, 2015, DOI: doi.org/10.1016/C2012-0-07633-8

19) H. NasrNasr et al. *„Superficial thrombophlebitis (superficial venous thrombosis)“* vol 350., no 1, pp 2039, 2015, DOI: 10.1136/bmj.h2039

20) C. Jerjes-Sanchez *„Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease?“* vol 26., no 1, pp 3-4, 2005, DOI: doi.org/10.1093/eurheartj/ehi041

21) H.J. Leu et al. *„Phlebosclerosis, phlebothrombosis, and thrombophlebitis: A current perspective“* vol 5., no 4, pp 183-192, 1996, DOI: doi.org/10.1016/1054-8807(96)00026-9

22) Yoshinori M. et al. *„Declined Activities of Daily Living as Immobility Syndrome in an Uninfected Elderly Patient Amidst a Cluster of COVID-19 Infections“* vol 13., no 9, pp 1, 2021, DOI: 10.7759/cureus.17677

23) B. Kadlec a kol. *„Prevence a léčba tromboembolické nemoci u onkologických pacientů“* vol 12., no 2, pp 78-86, 2010, https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/02/06.pdf

24) J. Gumulec *„Prevence žilního tromboembolizmu“* vol 11., no 10, pp 458-462, 2009, https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/10/06.pdf

25) NHLBI *„Blood Tests“* 2022, WWW: https://www.nhlbi.nih.gov/health/blood-tests

26) D. Gunawardena et al. *„Reliability of Parameters of Complete Blood Count With Different Storage Conditions“* vol 31., no 2, pp 6, 2017, DOI: 10.1002/jcla.22042

27) Y. Zhao et al. *„Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens“* vol 35., no 5, pp 566-570, 2013, DOI: 10.1111/ijlh.12113

28) AETNA *„Prothrombin Time (INR) Home Testing Devices“* vol 173, no 1, pp 1, 3. 11. 2022 https://www.aetna.com/cpb/medical/data/100_199/0173.html

29) M.B. Mijovski *„Advances in monitoring anticoagulant therapy“* vol 90., no 1, pp 197-213, 2019, DOI: 10.1016/bs.acc.2019.01.005

30) E. Javinsky *„Hematology and Immune-Related Disorders“* vol 1., no 25, pp 643-703, 2012, DOI: 10.1016/B978-1-4377-0660-4.00025-9

31) J.D. Vanderwerf et al. *„Critical Care Neurology Part II“* vol 144., no 40, pp 743-764, 2017, DOI: 10.1016/B978-0-444-63599-0.00040-5

32) R.B. Ford et al. *„Laboratory Diagnosis and Test Protocols“* vol 5., no 1, pp 551-634, 2012, DOI: 10.1016/B978-1-4377-0798-4.00005-0

33) M. Böhm-Weigert et al. *„Long-and short-term in vitro D-dimer stability measured with INNOVANCE D-Dimer“* vol 103., no 2, pp 461-465, 2010, DOI: 10.1160/TH09-04-0230

34) T.W. Stief *„The fibrinogen functional turbidimetric assay“* vol 14, no1, pp 5-120, leden 2008, DOI: 10.1177/1076029607308031

35) K. Nordenholz et al. *„Pulmonary Embolism Risk Stratification: Pulse Oximetry and Pulmonary Embolism Severity Index“* vol 40., no 1, pp 1. ledna 2012, DOI: 10.1016/j.jemermed.2009.06.004

36) N. Kerk et al. *„The mechanism of melanoma-associated thrombin aktivity and von Willebrand factor release from endothelial cells“* vol 130., no 9, pp 2259-2268, 2010, DOI:10.1038/jid.2010.136

37) A. Mitrugno et al. *„The prothrombotic aktivity of cancer cells in the circulation“* vol 30., no 1, pp 11-19, 2016, DOI: 10.1016/j.blre.2015.07.001

38) Muxin Y. et al. *„Phosphatidylserine-exposing blood cells, microparticles and neutrophil extracellular traps increase procoagulant aktivity in patiens with pancreatic cancer“* vol 188., no 1, pp 5-16, 2020, DOI: 10.1016/j.thromres.2020.01.025

39) A. Falanga et al. *„Mechanisms and risk factors of thrombosis in cancer“* vol 118., no 1, pp 79-83, 2017, DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.003

40) K. Suzuki-Inoue *„Platelets and cancer-associated thrombosis: focusing on the platelet activation receptor CLEC-2 a podoplanin“* vol 134., no 22, pp 1912-1918, 2019, DOI 10.1182/ blood.2019001388.

41) L. Plantureux et al. *„Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis“* vol 10., no 11, pp 23, 2018, DOI: 10.3390/cancers10110441

42) V.H. Almeida et al. *„Novel Aspects of Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer-Associated Thrombosis“* vol 8., no 7, pp 18, 2019, DOI: 10.3390/cells8070716

43) W. Cao et al. „*Modulation of Cellular NAD$^+$ Attenuates Cancer-Associated Hypercoagulability and Thrombosis via the Inhibition of Tissue Factor and Formation of Neutrophil Extracellular Traps*“ vol 22., no 21, pp 12085, 2021, DOI:10.3390/ijms222112085

44) Ch. Thålin et al. *„Neutrophil Extracellular Traps“* vol 39., no 9, pp 1724–1738, 2019, DOI:10.1161/ATVBAHA. 119.312463.

45) D. Flaherty *„Intracelulární signalizace a aktivace T buněk“* vol 1., no 7, pp 55-62, 2012, DOI:10.1016/B978-0-323-06947-2.10007-0

46) D.R. Edwards et al. *„ADAM metaloproteinázy“* vol 29., no 5, pp 258-289, 2008, DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.001

47) A. Mócsai et al. *„SYK tyrosinkináza: klíčový hráč v různých biologických funkcích“* vol 10., no 1, pp 387-402, 2016, DOI: 10.1038/nri2765

48) A. Nakanishi et al. *„The tumor suppressor PTEN interacts with p53 hereditary cancer (Review)“* vol 44., no 6, pp 1813-1819, 2014, DOI: 10.3892/ijo.2014.2377

49) A.M. Schwartz et al. *„Onkogen KRAS“* vol 12., no 65, pp 776-787, 2012, DOI:10.1016/B978-1-4557-0792-8.00065-9

50) K. Suzuki-Inoue et al. *„Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood“* vol 15., no 2, pp 219-229, 13.prosince 2016, DOI: 10.1111/jth.13590

51) J. Arnhold *„Acute-Phase Proteins and Additional Protective Systems“* vol 1., no 7, pp 205-228, 2020, DOI: 10.1016/B978-0-12-816388-7.00007-3

52) W. E Winter et al. *„Coagulation Testing in the Core Laboratory“* vol 48., no 4, pp 295-313, 2017 DOI: 10.1093/labmed/lmx050

53) V. Vyas et al. *„Acute Pulmonary Embolism“* vol 1., no 1, pp 1-48, 2022, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560551/

54) Ashorobi D. et al. *„Thrombosis“* vol 1., no 1, pp 1-28, 2022, S

55) P. Fadrus a kol. *„Intrakraniální nádory-diagnostika a terapie“* vol 12, no 7 a 8, pp 376-381, 2010, https://internimedicina.cz/pdfs/int/2010/07/10.pdf

56) R. Malý a kol. *„Ambulantní léčba žilního tromboembolizmu“* vol 13, no 5, pp 193-195, 2011, https://internimedicina.cz/pdfs/int/2011/05/02.pdf

57) P. Polák a kol. *„Co je C-reaktivní protein a jak správně interpretovat jeho zvýšené hodnoty?“* vol 18, no 1, pp 49-51, 2016, https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2016/01/13.pdf

58) D.S. Russell et al. *„Immunohistochemical detection of p53, PTEN, Rb, and p16 in canine osteosarcoma using tissue microarray“* vol 30, no 4, pp 493-654, 2018, DOI: doi.org/10.1177/1040638718770239

59) K.D. Vecchio et al. *„Investigation of the phosphatidylserine binding properties of the lipid biosensor, Lactadherin C2 (LactC2), in different membrane environments“* vol 50., no 1, pp 1-10, 2018, DOI: 10.1007/s10863-018-9745-0

60) P. Kuczia et al. *„Citrullinated histone H3, a marker of extracellular trap formation, is increased in blood of stable asthma patients“* vol 31., no 1, pp 1-10, 2020, DOI: doi.org/10.1186/s13601-020-00337-8

61) K. Nomura et al. *„Citrullinated Histone H3: Early Biomarker of Neutrophil Extracellular Traps in Septic Liver Damage“* vol 234., no 1, pp132-138, 2019, DOI: doi.org/10.1016/j.jss.2018.08.014

62) Y.V. Zhitnyuk et al. *„Deep cfDNA fragment end profiling enables cancer detection“* vol 21., no 26, pp 1-5, 2022, DOI: doi.org/10.1186/s12943-021-01491-8

63) Hideaki K. et al. *„Functional Evaluation of p53 and PTEN Gene Mutations in Gliomas“* vol 6., no 10, pp 3937–3943, 2000, https://aacrjournals.org/clincancerres/article/6/10/3937/287900/Functional-Evaluation-of-p53-and-PTEN-Gene

64) M.S. Tabatabaei et al. *„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)“* Online ISBN978-1-0716-2376-3, svazek 2508, pp 115-134, 2022, DOI: 10.1007/978-1-0716-2376-3_10

65) Ying J. et al. *„Elevated Soluble Podoplanin Associates with Hypercoagulability in Patients with Nephrotic Syndrome“* vol 28., no 1, pp 1-7, 2022, DOI: 10.1177/10760296221108967

66) K. Takiguchi et al. *„Soluble podoplanin as a biomarker in diffuse-type gastric cancer“* vol 47., no 3, pp 1, 2022, DOI: 10.3892/or.2022.8262

67) Hiroyasu I. et al. *„Early recognition of sepsis-induced coagulopathy using the C2PAC index: a ratio of soluble type C lectin-like receptor 2 (sCLEC-2) level and platelet count“* vol 33., no 6, pp 935-944, 2022, DOI: 10.1080/09537104.2021.2019694

68) G-Ch. Wang et al. *„Establishment of complete blood count reference intervals for Chinese preschoolers“* vol 31., no 5, pp 1-7, 2017, DOI: 10.1002/jcla.22095

69) L. Vermij et al. *„p53 immunohistochemistry in endometrial cancer: clinical and molecular correlates in the PORTEC-3 trial“* vol 35., no 1, pp 1475–1483, 2022, https://www.nature.com/articles/s41379-022-01102-x#Fig1

70) H. Karapetian *„Reptilase Time“* vol 992, no 1, pp 273–277, DOI: 10.1007/978-1-62703-339-8_20

71) E.H. Centeno et al. *„Anti-Xa assays: What is their role today in antithrombotic therapy?“* vol 86., no 6, pp 417-425, 2019, DOI: https://doi.org/10.3949/ccjm.86a.18029

72) Ch. Thålin et al. *„Quantification of citrullinated histones: Development of an improved assay to reliably quantify nucleosomal H3Cit in human plasma“* vol 18., no 10, pp 2732–2743, 2020, DOI: 10.1111/jth.15003

73) G. Becs et al. „*Haemodiafiltration elicits less platelet activation compared to haemodialysis“* vol 17., no 147, 2016, DOI: doi.org/10.1186/s12882-016-0364-x

74) I. Skornova et al. *„Multimer Analysis of Von Willebrand Factor in Von Willebrand Disease with a Hydrasys Semi-Automatic Analyzer—Single-Center Experience“* vol 11., no 11, pp 1-2153, 2021, DOI: 10.3390/diagnostics11112153

75) D.S. Russell et al. *„Immunohistochemical detection of p53, PTEN, Rb, and p16 in canine osteosarcoma using tissue microarray“* vol 30., no 4, pp 504-509,2018, DOI: 10.1177/1040638718770239

76) S. Volik et al. *„Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies“* vol 14., no 10, pp 898-908,2016, DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0044

77) J. Epidemiol *„High-Sensitivity C-Reactive Protein and Cancer“* vol 21., no 3, pp 161–168, 2011, DOI: 10.2188/jea.JE20100128

78) S.S. Bassuk et al. *„High-sensitivity C-reactive protein: Clinical importance“* vol 29., no 8, pp 439-493, 2004, DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2004.03.004

79) L. Badimon et al. *„C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis“* vol 9., no 430, pp 1-7, 2018, DOI: 10.3389/fimmu.2018.00430

80) H. Suzuki et al. *„Roles of Podoplanin in Malignant Progression of Tumor“* vol 11., no 3, pp 1-575, 2022, DOI: 10.3390/cells11030575

81) M. Quintanilla et al. *„Podoplanin in Inflammation and Cancer“* vol 20., no 3, 1-707, 2019, DOI: 10.3390/ijms20030707

82) Mads Nybo et al. *„Sample transportation – an overview“* vol 6., no 1, pp 39-43, 2019, DOI: 10.1515/dx-2018-0051

Seznam obrázků

1) J. Bauer „Antikoagulační terapie v prevenci a léčbě ischemických iktů“ vol 73/106., no 5, pp480-491, 2010, https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2010-5/antikoagulacni-terapie-v-prevenci-a-lecbe-ischemickych-iktu-33940/download?hl=cs
2) H. Suzuki et al. *„Roles of Podoplanin in Malignant Progression of Tumor“* vol 11., no 3, pp 1-575, 2022, DOI: 10.3390/cells11030575
3) A. Mitrugno et al. *„The prothrombotic aktivity of cancer cells in the circulation“* vol 30., no 1, pp 11-19, 2016, DOI: 10.1016/j.blre.2015.07.001
4) Preeti Kanika M. et al. *„The Provocative Roles of Platelets in Liver Disease and Cancer“* vol 11., no 1., pp 22, 2021 DOI: 10.3389/fonc.2021.643814
5) Muxin Y. et al. *„Phosphatidylserine-exposing blood cells, microparticles and neutrophil extracellular traps increase procoagulant aktivity in patiens with pancreatic cancer“* vol 188., no 1, pp 5-16, 2020, DOI: 10.1016/j.thromres.2020.01.025
6) W. Cao et al. „*Modulation of Cellular NAD^+ Attenuates Cancer-Associated Hypercoagulability and Thrombosis via the Inhibition of Tissue Factor and Formation of Neutrophil Extracellular Traps*“ vol 22., no 21, pp 12085, 2021, DOI:10.3390/ijms222112085
7) V.H. Almeida et al. *„Novel Aspects of Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer-Associated Thrombosis“* vol 8., no 7, pp 18, 2019, DOI: 10.3390/cells8070716
8) W. E Winter et al. *„Coagulation Testing in the Core Laboratory“* vol 48., no 4, pp 295-313, 2017 DOI: 10.1093/labmed/lmx050
9) S.U. Eisenhardt et al. *„Dissociation of Pentameric to Monomeric C-Reactive Protein on Activated Platelets Localizes Inflammation to Atherosclerotic Plaques“* vol 105., no 2, pp 128-137, 2009, DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.190611
10) L. Vermij et al. *„p53 immunohistochemistry in endometrial cancer: clinical and molecular correlates in the PORTEC-3 trial“* vol 35., no 1, pp 1475–1483, 2022, https://www.nature.com/articles/s41379-022-01102-x#Fig1