

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Fibrinogen
Bakalářská práce

2022

Nikola Hemplová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Fibrinogen
Bachelor thesis

2022

Nikola Hemplová

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Hemplová**
Osobní číslo: **C18220**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Fibrinogen**
Téma práce anglicky: **Fibrinogen**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis koagulačního faktoru fibrinogenu. Ve své práci nejprve popište stručně hemokoagulační kaskádu člověka. Zde se především zaměřte na uvedení přehledu funkcí koagulačních faktorů. Následně podrobně popište biomolekulu fibrinogenu, a to obzvláště jeho strukturu, syntézu, aktivaci a roli při hemostáze. Vedle toho uveďte také údaje popisující kromě hemokoagulační funkce také roli v jiných fyziologických pochodech (např. imunologických, reparačních, regulačních).

2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji:

Tuto práci s názvem Fibrinogen 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. 2022

Nikola Hemplová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph. D. za poskytnutí cenných rad a věcných připomínek během psaní bakalářské práce. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu při psaní práce a v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na glykoprotein fibrinogen. Nejprve je v práci popsána hemostáza a její jednotlivé části, zaměřené především na hemokoagulaci a fibrinolýzu. V další části se práce věnuje samotnému proteinu, jeho historii, struktuře, syntéze, možnosti vazby s dalšími buňkami nebo chování fibrinogenu jako proteinu akutní fáze. Dále jsou v práci popsána nejčastěji využívaná laboratorní stanovení pro zjištění koncentrace fibrinogenu. Také jsou v této práci zmíněny jednotlivé substituční složky při deficitu fibrinogenu. Poslední část je věnovaná patologii fibrinogenu při poruše syntézy jednotlivých fibrinogenových řetězců nebo jak fibrinogen reaguje v současnosti na COVID-19.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hemostáza, fibrin, fibrinogen, struktura, patologie

TITLE

Fibrinogen

ANNOTATION

This Bachelor thesis is focused on glycoprotein fibrinogen. Firstly, there is described haemostasis and its individual parts, mainly focused on haemocoagulation and fibrinolysis. The next part is devoted to the protein itself, its history, structure, synthesis, the possibility of binding with other cells or fibrinogen as an acute phase protein. Furthermore, in this work is described widely used laboratory detection to determine the concentration of fibrinogen. In the work is also mentioned the individual substitution components for fibrinogen deficiency. The final section is devoted to the pathology of fibrinogen in the event of synthesis Disorders or how fibrinogen currently responds to COVID-19.

KEYWORDS

Haemostasis, fibrin, fibrinogen, structure, pathology

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Struktura protrombinu	17
Obr. 2: Postupná polymerace fibrinu	21
Obr. 3: Produkty degradace fibrinu	23
Obr. 4: Struktura fibrinogenu.....	27
Obr. 5: Vazba fibrinogenu a α IIb β 3	30

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Srovnání koncentrací fibrinogenu	35
Tab. 2: Laboratorní diagnostika.....	42

OBSAH

1. ÚVOD.....	12
2. HEMOSTÁZA.....	13
2.1 HEMOKOAGULACE	14
2.1.1 PROTROMBIN/TROMBIN.....	16
2.2 FIBRINOLÝZA	18
2.2.1 PLAZMINOGEN/PLAZMIN.....	19
2.2.2 FIBRIN	20
3. FIBRINOGEN.....	24
3.1 HISTORIE.....	24
3.2 STRUKTURA	25
3.3 SYNTÉZA.....	28
3.4 VAZBA S TROMBOCYTY	29
3.5 FIBRINOGEN JAKO PROTEIN AKUTNÍ FÁZE.....	31
3.6 LABORATORNÍ STANOVENÍ FIBRINOGENU.....	32
3.6.1 CLAUSOVA METODA	33
3.6.2 STANOVENÍ FIBRINOGENU ODVOZENÉHO OD PT ČASU	34
3.6.3 IMUNOLOGICKÉ STANOVENÍ.....	34
3.7 LÉČBA FIBRINOGENM	36
3.7.1 KONCENTROVANÝ FIBRINOGEN	36
3.7.2 ČERSTVĚ ZMRAŽENÁ PLAZMA (FFP).....	37
3.7.3 KRYOPRECIPITÁT	38
4. PATOLOGIE	39
4.1 AFIBRINOGENEMIE	39
4.2 HYPOFIBRINOGENEMIE	40
4.3 DYSFIBRINOGENEMIE A HYPODYSFIBRINOGENEMIE.....	41
4.4 FIBRINOGEN A α -CHAIN AMYLOIDOSIS	42
4.5 FIBRINOGEN A COVID-19.....	43
5. ZÁVĚR.....	45
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46

SEZNAM ZKRATEK

α IIa	α -trombin
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
Arg	arginin
CRP	C-reaktivní protein
CRYO	kryoprecipitát
Cys	cystein
ER	endoplazmatické retikulum
FCP	produkty štěpení fibrinogenu
FDP	degradační produkty fibrinu
FFP	čerstvě zmražená plazma (<i>fresh frozen plasma</i>)
FpA	fibrinopeptid A
FpB	fibrinopeptid B
FReD	domény související s fibrinogenem
Gla	kyselina gama-linolenová
Gln	glutamin
Gly	glycin
GPIb α	receptor glykoproteinu
His	histidin
IL	interleukin
Lys	lysin
PAF	protein akutní fáze
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu 1
PAI-2	inhibitor aktivátoru plazminogenu 2
PLG	plazminogen
Pro	prolin
Pro-uPA	prourokináza
PT	protrombinový čas

RSE	rychlost sedimentace erytrocytů
TAFI	trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy
TF	tkáňový faktor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
uPA	urokináza – aktivátor plazminogenu
vWF	von Willebrandův faktor

1. ÚVOD

Fibrinogen je jednou z primárních složek koagulační kaskády s hmotností 330 kDa a po poškození tkáně rychle tvoří nerozpustnou matici (*Brown et Barker, 2014*). Je to jeden z nejhojnějších proteinů v plazmě, hned po albuminu a imunoglobulinech. Jeho fyziologické hladiny jsou 2-4 g/l a je syntetizován v játrech (*Mackie et al., 2003*). Fibrinogen má v těle důležité úkoly, jako je hojení ran a zánětů, ale jeho jeden z nejdůležitějších úkolů, je účast při primární a sekundární hemostáze. Poruchy fibrinogenu mohou vést ke krvácení nebo k trombotickým stavům. Většina faktorů je syntetizována játry, tudíž při poškození jater jsou často pozorovány nižší hladiny faktorů, kde jako první klesá fibrinogen.

Fibrinogen, jako protein akutní fáze, se při zánětlivých stavech zvyšuje stejně jako při menopauze, kouření, s vyšším věkem, při těhotenství nebo při užívání hormonální antikoncepce. Na druhou stranu konzumace alkoholu, fyzická zátěž nebo příliš častá konzumace ryb hladinu fibrinogenu snižují.

Ve své nepřeměněné formě také přispívá k agregaci krevních destiček prostřednictvím receptorů, které mají destičky na svém povrchu (*Rizzo et al., 2019*).

2. HEMOSTÁZA

Hemostáza je důležitý děj chránící organismus před vykrvácením při porušení endotelu cév, neboť dochází k zástavě krvácení. Skládá se ze čtyř kroků, které se navzájem ovlivňují a doplňují. Prvním krokem je vazokonstrikce cévy v místě poranění, čímž se omezí ztráty krve. Může být vyvolána nervovými reflexy, které jsou iniciovány bolestí, nebo může být způsobena lokální myogenní reakcí cévy, a to kontrakcí svaloviny. Další možností je humorální ovlivnění působením serotoninu, což je látka, která podporuje stahy svaloviny, nebo vlivem látky tromboxanu A₂, která je produkována aktivními krevními destičkami. Ten stimuluje aktivaci nových destiček a zvyšuje jejich agregaci. Důležitou humorální látkou je také adrenalin a nonadrenlin. Oba mají významné cirkulační vlastnosti v organismu.

Následujícím krokem je vytvoření trombocytární zátky, která vzniká aktivací, adhezí a nakonec agregací krevních destiček. Fyziologická hodnota trombocytů je $150\text{-}300 \cdot 10^9/l$ a jejich velikost je 2-4 μm . Jsou to bezjaderné buňky, které vznikají odštěpováním cytoplazmy megakaryocytů v kostní dřeni a podílí se na hemostáze.

Většina destiček za celý svůj život nepodstoupí interakci s odhaleným subendotelem cévy. Ovšem v místě cévního poranění dochází k tomu, že subendoteliální extracelulární matrice je vystavena krvi, ke které se destičky okamžitě váží. Tato matrice obsahuje několik adhezivních makromolekul, jako je von Willebrandův faktor (vWF), kolagen nebo fibronectin, které slouží jako ligandy pro navázání receptorů krevních destiček. Mezi těmito subendoteliálními látkami jsou přítomné fibrilární kolageny typu I a III, což jsou nejsilnější mediátory adheze krevních destiček, jelikož mají silný aktivační potenciál. Počáteční adheze mezi krevními destičkami a extracelulární maticí závisí na podmínkách, které jsou v cévách. Pokud je tok krve pomalejší, tak se destičky adherují především na kolagen a fibronectin. Při vyšší rychlosti je důležitá interakce mezi receptorem glykoproteinu s povrchem krevních destiček (GPIIb) a vWF, jelikož dochází ke zpomalení rychle tekoucích destiček. Tento proces zpomalení vede k tomu, že se zde mohou vytvořit další vazby, a to vede ke tvorbě trombu (*Broos, 2011*).

Krevní destičky se po navázání na kolagen, jenž má záporný náboj, adherují v místě poranění. Následkem aktivace mění trombocyty rychle svůj tvar, vysílají pseudopodie působením Ca^{2+} a trombosteninu, což je důležitý kontraktilní protein, který je odpovědný za jejich tvorbu. Tím, že se destičky aktivují, začnou produkovat látky, které stimulují další trombocyty a podporují jejich agregaci. Mezi tyto látky patří tromboxan A₂, jehož

prekurzorem je kyselina arachidonová, která se nachází v membráně destiček, a serotonin, jenž stimuluje stahy svaloviny. Na povrchu trombocytů jsou také přítomné glykoproteinové receptory, které váží vWF a fibrinogen. Tyto navázané faktory napomáhají agregaci, čímž dochází k zakrytí odhalené trhliny na cévě.

Třetím krokem hemostázy je hemokoagulace, tedy vlastní srážení krve. Skládá se ze dvou částí, a to z vnitřní a vnější kaskády, které se liší typem aktivačního stimulu. Oba systémy se navzájem doplňují a jejich cílem je aktivace trombinu a následná přeměna rozpustného proteinu fibrinogenu na nerozpustný fibrin.

Poslední částí hemostázy je fibrinolýza, která vede k degradaci primární zátky po zahojení rány. Tohoto procesu se účastní plazmin, který se vyskytuje v neaktivní formě jako plazminogen. Plazmin štěpí fibrin na jeho degradační produkty (FDP) a je aktivován tkáňovým aktivátorem plazminogenu nebo urokinázou.

2.1 HEMOKOAGULACE

Hemokoagulace je zahájena expozicí krve transmembránovému proteinovému tkáňovému faktoru (TF). Za fyziologických podmínek není TF uvolňován krevními ani endoteliálními buňkami, které jsou v přímém kontaktu s koagulačními proteázovými zymogeny cirkulujícími v plazmě. Toto oddělení extravaskulárního TF a cirkulujících faktorů srážení plazmy brání nevhodné aktivaci koagulace za fyziologických podmínek (*Antoniak, 2018*).

Většina faktorů srážení jsou prekurzory proteolytických enzymů, zymogenů, které cirkulují v krvi v neaktivní formě. Většina faktorů je produkována játry, mimo faktory III, IV a VIII. Tyto proteiny procházejí posttranslační modifikací, kdy dochází ke karboxylaci reziduí kyseliny glutamové. Úpravy umožní těmto faktorům vázat vápník, další dvojmocné kationty a podílet se na srážecí kaskádě (*Palta et al., 2014*).

Nejdůležitějším dodavatelem prokoagulačních a antikoagulačních proteinů je krev, která je zároveň zdrojem trombocytů, jenž přispívají k hemostatickému procesu. Pokud se naruší endoteliální výstelka perforujícím poraněním, extravaskulární část a krev interagují a vyvolávají lokální koagulační reakci. Při této reakci dochází ke zmírnění ztráty krve a zahajuje se proces cévní opravy (*Mann et al., 2009*).

Schopnost srážení krve závisí na funkci a na stavbě dvou zásadních komplexů krevní srážlivosti, jsou jimi komplexy Xázy a protrombinázy. Tyto příbuzné proteinové

komplexy mají podobnou sestavu na buněčném povrchu. Xázy přeměňují faktor X na aktivní faktor Xa a protrombinázy konvertují protrombin na trombin (*Oliva et al., 2020*). Hemokoagulační kaskáda je klasifikována na vnitřní a vnější cestu, které se sbíhají při aktivaci faktoru X.

Vnější cesta je považována za první krok u hemostázy zprostředkované plazmou. Za fyziologických podmínek cévní endotel minimalizuje kontakt mezi TF a plazmatickými prokoagulancii, ale při cévní poruše dojde k jeho odhalení a naváže se s faktorem VIIa a vápníkem, aby mohlo dojít k přeměně faktoru X na faktor Xa.

Při vnitřní cestě dochází k aktivaci trombinu pomocí faktoru XII. Nejdříve dochází k aktivaci faktoru XI pomocí faktoru XII, vysokomolekulárního kininogenu a prekalkreinu. Aktivovaný faktor XI následně aktivuje faktor IX, který pak působí společně s faktorem VIII, čímž dochází k aktivaci faktoru X. Nakonec aktivovaný faktor X společně se svým kofaktorem, faktorem V, tkáňovými fosfolipidy, destičkovými fosfolipidy a vápníkem vytvoří protrombinový komplex a dojde k přeměně protrombinu na trombin. Vzniklý trombin dále štěpí rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin a aktivuje faktor XIII, který zkříží fibrinové polymery. Tímto se vytvoří fibrinová síť, která zpevní sraženinu a vytvoří konečnou sekundární hemostatickou zátku (*Palta et al., 2014*).

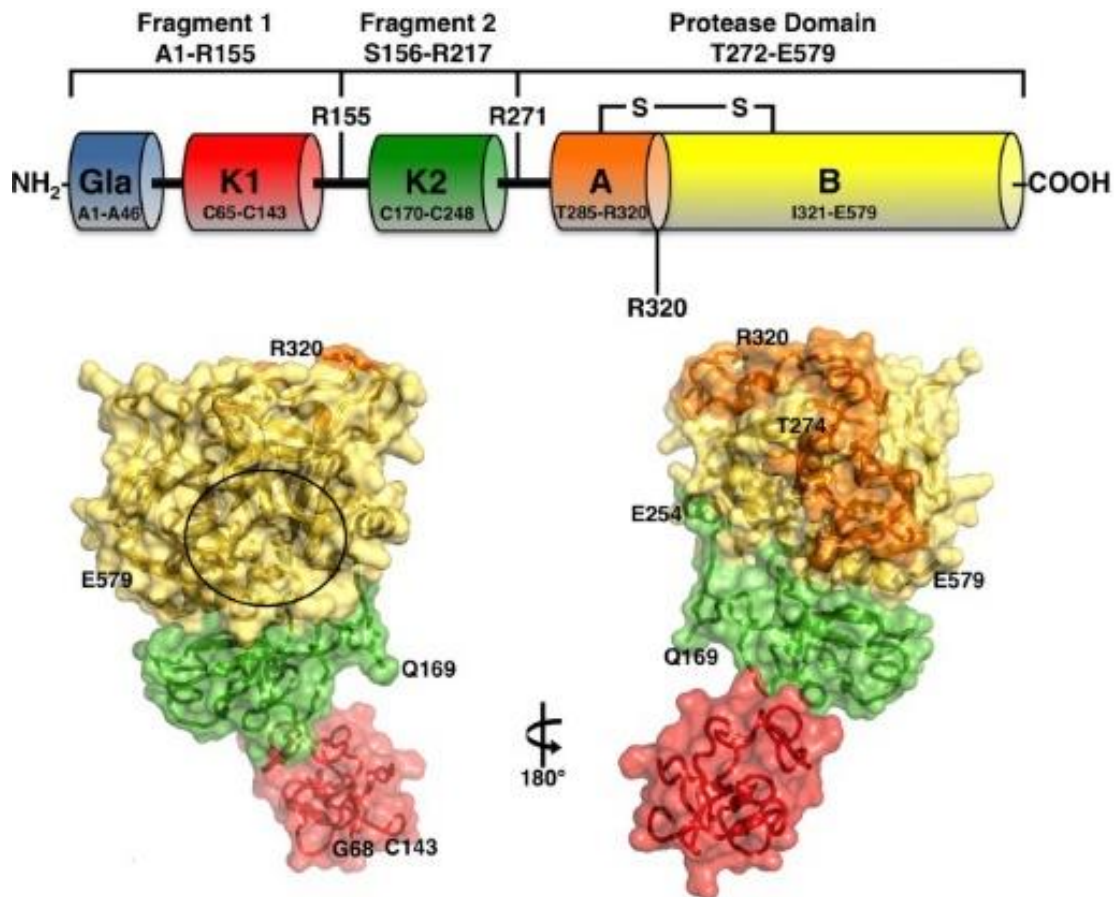
2.1.1 PROTROMBIN/TROMBIN

Protrombin neboli koagulační faktor II je vitamín K-dependetní a vyskytuje se v poměrně vysokém množství v krvi, kde cirkuluje o koncentraci 0,1 mg/ml a o poločase 60 hodin (*Pozzi et Di Cera, 2014*).

Protrombin se skládá z fragmentu 1 (rezidua 1-155), fragmentu 2 (rezidua 156-271) a proteázové domény (rezidua 272-579) (Obr.1). Fragment 1 obsahuje doménu Gla (rezidua 1-46) a kringle-1 (rezidua 65-143). Fragment 2 obsahuje druhý kringle (rezidua 170-248) a proteázová doména obsahuje řetězec A (rezidua 272-320) a katalytický řetězec B (rezidua 321-579). Tři linkers domény spojují kringle-1 s doménou Gla (rezidua 47-64), dva kringly (rezidua 144-169) a kringle-2 s řetězcem A (rezidua 249-284). Na vazbě protrombinu na membránu destiček se podílí doména Gla v přítomnosti Ca^{2+} . Kringle-1 a kringle-2 interagují s kofaktorem Va stejně jako rezidua v katalytickém řetězci B, která jsou rozptýlena mezi autolytickou kličkou a exositem I. Faktor Xa reaguje s kringlem-2 a s rezidui v blízkosti exositu II B řetězce (*Pozzi et al., 2013*). Kringly jsou malé strukturní prvky, které obsahují asi 60 aminokyselin, nacházejí se v proteinech genomu a zprostředkovávají interakce protein-protein (*Padmanabhan et al., 1994*).

V předposledním kroku koagulační kaskády se protrombin proteolyticky přemění na aktivní proteázu trombin, který následně katalyzuje přeměnu fibrinogenu na nerozpustnou fibrinovou sraženinu. Podílí se také na aktivaci krevních destiček prostřednictvím proteinázou aktivovaného receptoru 1 a také zpětně kontroluje koagulační odpovědi zprostředkováním trombomodulin dependentního proteinu C (*Pozzi et Di Cera, 2014*). K přeměně protrombinu na trombin dochází v přítomnosti protrombinázového komplexu, který se skládá z proteázového faktoru Xa, kofaktoru Va, fosfolipidů a Ca^{2+} (*Pozzi et Di Cera, 2014*). Aktivace protrombinu protrombinázou zahrnuje štěpení na dvou odlišných místech, a to Arg-271 a Arg-320, dvěma alternativními cestami (*Chinnaraj et al., 2018*). V závislosti na pořadí štěpení může docházet k aktivaci přes dva možné meziprodukty, a to buď meizotrombin, nebo neaktivní intermediární pretrombin-2, aby vznikl α -trombin (αIIa) (*Whelihan et al., 2012*). Rozštěpením na Arg-271 odstraní pomocné domény, a to fragment 1 a fragment 2, čímž vznikne neaktivní prekurzor protrombin-2. Štěpení na Arg-320 odděluje řetězce A a B, které zůstávají spojeny disulfidovou vazbou (Cys-293-Cys-439), čímž vznikne aktivní meziprodukt, a to meizotrombin (*Pozzi et al., 2013*).

Na nedestičkovém povrchu nebo na syntetických fosfolipidových váčcích dochází k aktivaci protrombinu prostřednictvím meizotrombinu. Pokud ale dochází k aktivaci protrombinu na povrchu krevních destiček, tak se tohoto účastní pretrombin-2 (Whelihan et al., 2012).



Obr. 1: Struktura protrombinu

Výše je schématické znázornění protrombinu složeného z fragmentu 1, fragmentu 2 a proteázové domény. Níže je rentgenová krystalická struktura protrombinu s kringle-1 (červená), kringle-2 (zelená) a proteázovou doménou (A řetězec oranžový a B řetězec žlutý). Aktivní oblast je označena kružnicí (Pozzi et al., 2013).

2.2 FIBRINOLÝZA

Za fyziologických podmínek je hemokoagulační kaskáda i fibrinolýza přesně regulována úměrným množstvím substrátů, aktivátorů, inhibitorů, receptorů a kofaktorů (*Chapin et Hajjar, 2015*). Molekulární vazby mezi těmito systémy umožňují lokalizovat a včasné odstranit buď probíhající, nebo akutně vyvolanou fibrinovou sraženinu. Tyto koordinované molekulární pochody zajišťují tekutost krve a zároveň zabraňují její ztrátě. Aktivace koagulační kaskády nakonec vede k produkci trombinu, který vede ke tvorbě trombu přeměnou fibrinogenu na fibrin a k aktivaci trombocytů. Plazminogen (PLG) je cirkulující zymogen v plazmě, který je přeměňován na plazmin serinovými proteázami, tkáňovým PLG aktivátorem (tPA) a urokinázou (uPA). Plazmin je hlavní fibrinolytickou proteázou (*Cesarman-Maus, et al., 2005*).

TPA se syntetizuje a uvolňuje endoteliálními buňkami, uPA je produkován monocyty, makrofágy a močovým epitelem. Obě proteázy mají v oběhu krátký poločas, a to 4-8 min, a to v důsledku přítomnosti vysokých koncentrací inhibitoru aktivátoru PLG-1 (PAI-1) (*Chapin et Hajjar, 2015*). Prostřednictvím mechanismu pozitivní zpětné vazby štěpí plazmin tPA i uPA a přeměňuje je z jednoho řetězce na aktivnější dvouřetězcové polypeptidy. Fibrin, jakožto hlavní substrát plazminu, reguluje svou vlastní degradaci vázáním PLG i tPA na jeho povrch, čímž zvyšuje tvorbu plazminu. Při absenci fibrinu je tPA slabým aktivátorem pro PLG, ovšem v přítomnosti fibrinu se zvyšuje jeho účinnost až o dva řády (*Rijken et Uitte de Willige, 2017*).

Jakmile je plazmin vytvořen, dochází tedy ke štěpení fibrinu, vytváření rozpustných degradačních produktů a k odhalování zbytků karboxy-terminálního lysinu (Lys). Kringle-2 z tPA a 1 a 4 z PLG obsahují místa, která vážou Lys, čímž zprostředkovávají další vazbu na fibrin. To vede ke zvýšené tvorbě plazminu a odstraňování fibrinu. Vazba může být blokována analogy Lys, jako je kyselina epsilonaminokapronová, kyselina tranexamová a trombinem aktivovaný inhibitor fibrinolýzy (TAFI). Pokud je aktivován trombinem, TAFI, jakožto karboxypeptidáza, odstraňuje karboxy-terminálního rezidua Lys. Z tohoto důvodu se snižuje tvorba plazminu, stabilizují se fibrinové tromby a vytváří regulační spojení mezi koagulací a fibrinolýzou (*Kolev et Longstaff, 2016*).

Rozpouštění fibrinu je také regulováno inhibitory aktivace PLG, jako je inhibitor PAI-1, inhibitor aktivátoru PLG-2 (PAI-2) a α 2-antiplazmin (A2AP). Plazmin vázaný na fibrin je chráněn před A2AP, a to z důvodu obsazenosti míst vázajících Lys.

TAFI na druhou stranu snižuje tuto ochranu tím, že odstraňuje zbytky Lys na fibrinu (*Chapin et Hajjar, 2015*).

Různé typy buněk navíc podporují tvorbu plazminu prostřednictvím exprese buněčných povrchových receptorů. Endoteliální buňky, monocyty, makrofágy a neutrofilů vážou PLG stejně jako tPA i uPA. Receptory těchto buněk lokalizují fibrinolytickou aktivitu a slouží jako kofaktory při probíhající tvorbě plazminu (*Cesarman-Maus, et al., 2005*).

2.2.1 PLAZMINOGEN/PLAZMIN

Zymogen PLG je vylučován jako jednořetězcový glykoprotein játry a cirkuluje v krvi v neaktivní formě (*Chana-Munoz et al., 2019*). Skládá se z N-terminálního aktivačního peptidu, pěti kringle domén a karboxy-terminální domény serinové proteázy. Kringle domény jsou peptidy tvořené 80 aminokyselinami a jsou propojeny triple-disulfidickou vazbou. Tyto domény jsou zodpovědné za vazbu substrátu a interakci PLG s buněčnými povrchovými proteiny. Obsahují vazebná místa pro Lys a specificky váží ω -aminokyseliny, jako je kyselina ϵ -aminokaproová a analogy Lys (*Urano et al., 2018*).

Spojení PLG s buněčnými receptory mění konformaci PLG z T konformace, která je uzavřená a nepřístupná nechtěné aktivaci na R konformaci, jenž je volnější, a usnadní jeho aktivaci prostřednictvím uPA nebo tPA (*Didiasova et al., 2014*). UPA je syntetizována a secernována jako zymogen prourokinázy (pro-uPA) a aktivuje se po navázání na svůj buněčný receptor (uPAR/CD87) migrujících buněk. Mezi ně patří aktivované leukocyty, endoteliální buňky, fibroblasty, ale také nádorové buňky. Po navázání na receptor je neaktivní jednořetězcová pro-uPA zpracovaná na aktivní dvouřetězcovou uPA (*Zwirzitz et al., 2018*).

TPA je syntetizován a sekretován z vaskulárních endoteliálních buněk a postupně se konvertuje z jednořetězcové formy na dvouřetězcovou, která následně katalyzuje plazmin nebo se váže na fibrin. Jakmile se vytvoří plazmin, tak začne štěpit proteiny buněčného povrchu na C-koncových peptidových vazbách Lys, což zesiluje akumulaci PLG na nově vytvořených C-terminálních Lys zbytcích na povrchu endoteliálních buněk (*Urano et al., 2018*).

Existují tři způsoby, jak udržet aktivaci PLG pod kontrolou. Za prvé uPA i tPA jsou citlivé na inhibici PAI-1. Na PAI-2 se vykazuje hlavně inhibiční aktivita vůči uPA a je méně účinný proti tPA (*Didiasova et al., 2014*). Za druhé přímé inhibitory plazminu, $\alpha 2$ -antiplazmin, jsou přítomny v plazmě a blokují pouze aktivitu volného plazminu, zatímco plazmin navázaný na buněčný povrch nechává intaktní. Za třetí PLG interaguje přes místa vázající Lys, která jsou umístěna v jeho kringle doménách a s Lys obsaženými v receptorech, což omezuje aktivaci na buněčném povrchu (*Zwirzitz et al., 2018*).

2.2.2 FIBRIN

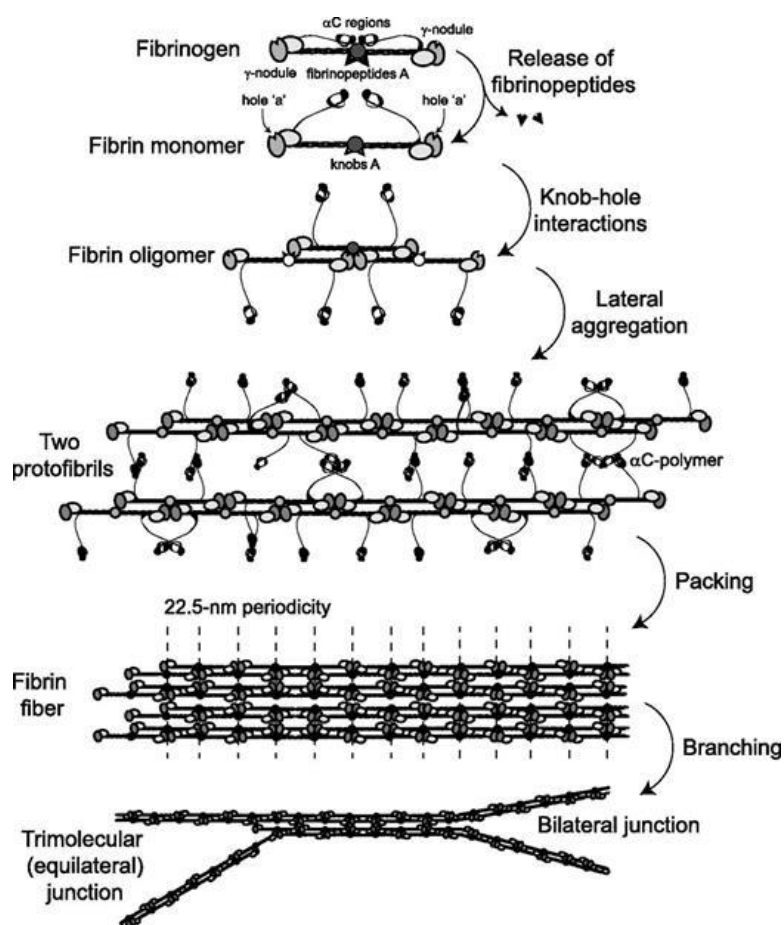
Fibrin je konečný produkt srážení krve, který tvoří pevnou strukturu hemostatických sraženin a trombů v cévách. Je také hlavní složkou extracelulárního matrixu a podílí se na rozsáhlé škále buněčných procesů, jako je buněčná adheze, migrace, proliferace, diferenciacce a angiogeneze. Fibrin se hojně využívá jako všestranný biomateriál v tkáňovém inženýrství, jako transportní prostředek pro buňky, léky, růstové faktory, geny a jako matrice pro kultivaci buněk (*Zhmurov et al., 2018*).

Přeměna fibrinogenu na fibrin je zprostředkována trombinem, který se váže na centrální oblast fibrinogenu a katalyzuje štěpení dvou krátkých peptidů, a to 16 zbytkového fibrinopeptidu A (FpA) a 14 zbytkového fibrinopeptidu B (FpB). Tyto krátké peptidy se nacházejí na N-terminální části $A\alpha$ a $B\beta$ řetězců fibrinogenu (*Riedel et al., 2011*). FpA se odštěpuje rychleji než FpB, ale jak polymerace postupuje, rychlost uvolňování FpB se zvyšuje. Uvolněním FpA se odhalí N-terminální α -řetězcový motiv Gly-Pro-Arg (GPR), nazývaný jako knoflík „A“. Ten je komplementární k otvorům „a“, jež jsou umístěny v γ -uzlíkách jiné molekuly fibrinu a poskytují interakci A:a. Štěpení FpA a expozice knoflíků „A“ je nezbytné k vytvoření fibrinové sraženiny (*Weisel et Litvinov, 2013*).

Uvolnění FpB odhaluje N-terminální motiv β -řetězce Gly-His-Arg-Pro (GHRP), nazývaný jako knoflík „B“. Tento knoflík je komplementární k otvoru „b“ umístěnému v globulárním β -uzlu (*Weisel et Litvinov, 2013*). Tato interakce B:b je méně zásadní než A:a, jelikož fibrinové sraženiny mohou vznikat i bez přítomnosti B:b (*Brown et Barker, 2014*). Po počátečním štěpení dochází k interakci mezi dvěma sousedními molekulami za vzniku nekovalentních vazeb mezi oblastí E jedné molekuly a oblastí D jiné molekuly, čímž se vytvoří polorozložený dimer. K němu se přidávají další molekuly, aby vznikly

dvouvláknové protofibrily. Ty dosahují délky 600-800 nm a poté se laterálně spojují s jinými protofibrily za vzniku fibrinových vláken. Tento proces je posílen interakcemi mezi doménami α C sousedních molekul. Vlákna se pak dále větví, což vede k vytvoření gelu vyplňujícího prostor (Brown et Barker, 2014).

Během a po polymeraci jsou fibrinová vlákna kovalentně zesíťována faktorem XIIIa. FXIIIa zesíťuje α i γ řetězce fibrinu prostřednictvím intermolekulárních ϵ (γ -glutamyl)lysolových vazeb mezi γ 406Lys jednoho řetězce a γ 398/399Gln jiného γ -řetězce. Stejně vazby se tvoří pomaleji na C-terminální části α -řetězců za vzniku γ - γ , α - α a γ - α příčných vazeb. Γ - γ se tvoří téměř okamžitě po aktivaci FXIII a zesíťování probíhá rychleji. Husté kovalentní zesíťování mezi protofibrily vede k nevratnému procesu a stabilizuje fibrinové polymery, čímž je dělá mechanicky odolnými a pevnými vůči lýze (Obr. 2) (Lim et al., 2003).



Obr. 2: Postupná polymerace fibrinu

(1) uvolnění FpA/B z fibrinogenu, (2) sestavení monomerního fibrinu prostřednictvím interakcí knoflík-díra, (3) laterální agregace protofibril, (4) vznik vlákn z protofibril, (5) tvorba fibrinové sítě (Weisel et Litvinov, 2013).

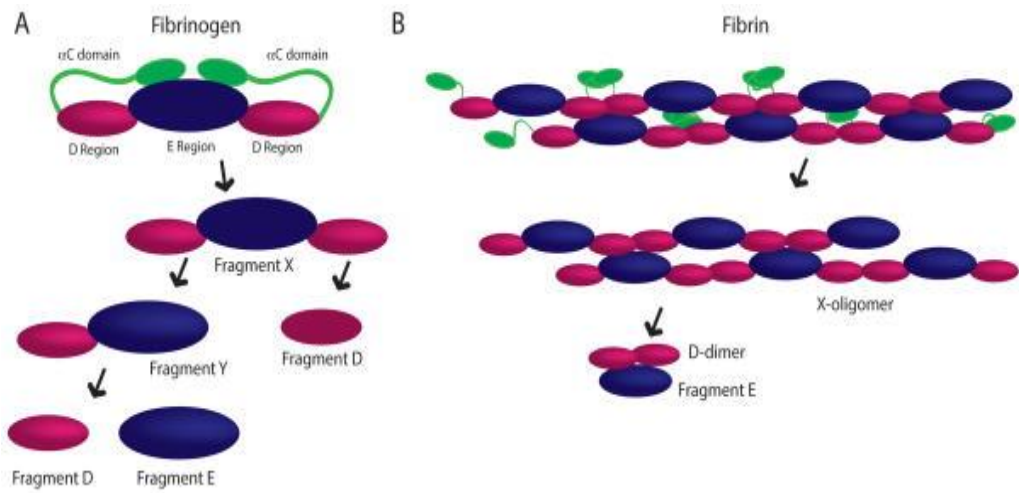
2.2.2.1 DEGRADAČNÍ PRODUKTY

Produkty degradace fibrinu (FDP) se začínají tvořit, pokud je aktivován PLG a plazmin začne degradovat trombus. Iniciace srážení také zahrnuje uvolnění fibrinopeptidu A a B. Dochází také ke vzniku fragmentů D a E a menších fragmentů, jako je peptid B β 15-42 (*Jennwein et al., 2011*).

Při proteolytické degradaci fibrinu mohou také vznikat meziprodukty, polypeptidy nebo oligomery, které jsou známé jako XL-FDP neboli zesítující produkty degradace fibrinu. Proteolýza fibrinu(ogenu) začíná v C-terminální části řetězce, ze kterého jsou odstraněny krátké peptidy. Po následném odpojení krátkého peptidu z B β řetězce se molekula fibrinu(ogenu) přemění na meziprodukty X. Po asymetrickém štěpení těchto meziproduktů vznikají dva fragmenty, a to D a Y. Fragment Y se ihned štěpí na fragmenty E a D. Pokud není přítomný vápník, tak se fragment D dále štěpí na menší fragmenty (lehký fragment D3). Kompletní degradace fibrinu(ogenu) tedy vede k vytvoření dvou molekul fragmentu D a jednoho fragmentu E (Obr. 3) (*Kołodziejczyk et Ponczek, 2013*).

Proto, aby se D-dimery vytvořily, je zapotřebí tří enzymů, a to trombinu, XIIIa a plazminu. Proces začíná v momentě, kdy trombin konvertuje fibrinogen na monomery fibrinu. Tyto monomery poté vytváří fibrinové polymery prostřednictvím nekovalentních interakcí, založených na alosterických změnách v proteinu v důsledku trombinového štěpení. Fibrin je posílen interakcemi s faktorem XIII, který po aktivaci trombinem zesítuje D domény sousedních fibrinových monomerů (*Johnson et al., 2019*). Jeho poločas rozpadu je 8 hodin a v krvi jsou hladiny D-dimerů zvýšeny již po dvou hodinách od vytvoření fibrinu. Za fyziologických podmínek je hladina D-dimerů nízká, ale s postupujícím věkem se zvyšuje (*Zhang et al., 2018*).

Jednotlivé FDP mohou mít imunomodulační účinky. Fibrinopeptid B může sloužit jako chemoatraktant pro neutrofilů, monocytů a makrofágů. Fragment B β 15-42 N-terminálního β řetězce má jak vlastnosti indikující cytokiny, tak imunosupresivní vlastnosti, jenž chrání endoteliální bariéry a mohou chránit orgány před ischemií (*Chapin et Hajjar, 2015*).



Obr. 3: Produkty degradace fibrinu

Degradační produkty vzniklé působením plazminu z fibrinogenu (A) a fibrinu (B). C řetězce jsou zobrazeny zeleně, D fragmenty růžově a E fragmenty modře (Brown et Barker, 2014).

3. FIBRINOGEN

3.1 HISTORIE

Již v pátém a čtvrtém století před naším letopočtem si hippokratovští lékaři všimli přítomnosti vláken v cirkulující krvi. Ovšem až v sedmnáctém století, v roce 1666, Marcello Malpighi (1628-1694) objevil fibrin, když zkoumal srdeční tromby a krevní sraženiny *in vitro* pomocí světelného mikroskopu. Zjistil, že jejich struktura je velmi podobná. Poprvé popsal jak červené krvinky, tak i síťovinu s vláknitou strukturou, kterou dnes známe jako fibrin (*Costa-Filho et al., 2016*). Tyto objevy jsou popsány v Malpighiho „De Polypo Cordis“, který byl publikován v Bologni v roce 1666. O více jak sto let později, v roce 1788, Antoine Fourcroy (1755-1809) fibrin pojmenoval (*Douglas, 1999*). Foucroy řekl, že existují tři třídy živočišné hmoty, a to želatina, želé, které je možné extrahovat vařením z kožních šlach, membrán a dalších podobných tkání. Druhou třídou byl albumin, který byl rozpustný ve vodě, ale byl vysrážen teplem, kyselinami nebo alkoholem. Byl nalezen ve vaječném bílku, krevním séru a mléčném kaseinu a obsahoval vyšší podíl dusíku než želatina. Poslední třídou byl právě fibrin, který vytvářel sraženiny v krvi a prokázal, že prekurzorem fibrinu je rozpustná látka přítomná v plazmě, ale ne v séru (*Fourcroy, 1788*).

V roce 1838 Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) pojmenoval „protein“ jako „organický oxid fibrinu a albuminu“. Berzelius v dopise Gerardusovi Johannesovi Mulderovi (1802-1880) ze dne 10. července 1838 poprvé navrhl termín „protein“ k popisu odlišné třídy biomolekul a uvedl: „Název protein, který navrhuji pro organický oxid fibrinu a albuminu, jsem chtěl odvodit z řeckého slova proteios, protože se zdá být primitivní.“ (*Berzelius, 1838*). V roce 1847 Rudolf Virchow (1821-1902) fibrinogen pojmenoval. Tento termín navrhl pro pomaleji srážející se látku, než která se normálně sráží ve stejné biologické kapalině, a uvedl „Kdybychom tomu chtěli dát jméno, mohl by se jmenovat fibrinogen.“ (*Virchow, 1847*). V roce 1859 nezávisle na Virchowovi Denis ve svém díle „Mémoire sur le sang“ rozpoznal, že plazma obsahuje srážecí látku odlišnou od fibrinu a snažil se tento protein vyčistit a charakterizovat (*Denis, 1859*).

Hermann Adolf Alexander Schmidt (1831-1894) v roce 1872 studoval přeměnu fibrinogenu na fibrin a prokázal, že se jedná o enzymatický proces (*Costa-Filho et al., 2016*). O pár let později, v roce 1879, Olof Hammarsten (1841-1932) připravil první purifikovaný fibrinogenový preparát. Tato metoda pro separaci

fibrinogenu závisela na jeho vysrážení přidáním stejného množství nasyceného roztoku NaCl do plazmy. Využívala se citrátová koňská plazma. Potom, co zůstala jeden den v chladné místnosti, se zfiltrovala, zneutralizovala na lakmus zředěnou kyselinou octovou a byla z poloviny nasycena NaCl. Srážení probíhalo při pokojové teplotě, kdy se pomalu přidávala sůl bez vápníku. Po přidání veškerého solného roztoku musela uplynout alespoň hodina, aby se potom mohla získat sraženina z plazmy prostřednictvím centrifugace. Sraženina byla znovu rozpuštěna v 5% roztoku NaCl za jemného protřepávání. Tento proces se třikrát opakoval, roztok zůstával v chladné místnosti jenom mezi jednotlivými sraženinami (*Morrison et al., 1948*).

3.2 STRUKTURA

Protáhlá struktura lidského fibrinogenu dlouhého 45 nm je tvořena symetrickými jednotkami, které dimerizují přes centrální oblast E. Každá symetrická jednotka (protomer) je tvořena třemi peptidovými řetězci, a to $A\alpha$, $B\beta$ a γ , které vystupují z N-terminální části E oblasti. Tvoří prodlouženou šroubovitou spojnicí, která končí ve dvou globulárních doménách tvořící D oblast (*Köhler et al., 2015*). Zralý lidský $A\alpha$ řetězec se skládá z 610 aminokyselin. Lze jej rozdělit na FpA (16 N-koncových aminokyselin řetězce $A\alpha$), který se odštěpí během přeměny fibrinogenu na fibrin, a na řetězec fibrinu α , který zůstává v hexameru fibrinu. Nejvýraznějším strukturálním rysem řetězce $A\alpha$ je α -helix (aminokyseliny $A\alpha$ G48- $A\alpha$ R159), zbytek molekuly kromě β -vlásky je neuspořádaný. Řetězec $A\alpha$ je z 1-2 % vyjádřen 847 aminokyselinami, obsahující doménu související s fibrinogenem (FReD, aminokyseliny $A\alpha$ 611- $A\alpha$ L844) na C-konci hlavní sestřihové varianty. Toto rozšíření je známé jako oblast α E. Nejvýraznějším sekundárním strukturálním rysem fibrinogenu FReD je centrální β -list, který spolu se dvěma krátkými α -helixy a β -vláskou tvoří B-subdoménu. A-subdoména, která obsahuje N-terminální části FReD, se skládá ze tří β -řetězců. P-subdoména, která je vložena mezi šestým a sedmým β -řetězcem B-subdomény, obsahuje dva krátké α -helixy a β -list. P-subdoména obsahuje vazebné místo pro Ca^{2+} a také je to místo polymerace. Jediná exprimovaná varianta $B\beta$ řetězce má ve své zralé formě 461 aminokyselin. Podobně jako řetězec $A\alpha$ řetězec $B\beta$ obsahuje FpB (14 N-terminálních aminokyselin), který se odštěpí při konverzi fibrinogenu na fibrin a přilehlý β řetězec. Na neuspořádaný konec $B\beta$ navazuje α -helix (aminokyseliny

B β G79-B β C193) a C-terminální FReD (aminokyseliny B β S207-B β P456) (Sovová *et al.*, 2020). Fibrinogenový řetězec γ , který neobsahuje žádný fibrinopeptid, má 411 aminokyselin a je z 8-15 % vyjádřen jako γ' . Tyto menší varianty γ -řetězce vznikají alternativním zpracováním primárního transkriptu mRNA, což vede k tvorbě 20 aminokyselinové sekvence, která obsahuje dva sulfátové tyrosiny. γ' -řetězce tvoří 8 % celkového fibrinogenového γ -řetězce (Mosesson, 2005). γ -řetězec je homolog řetězce B β , obsahuje N-terminální (aminokyseliny γ C23- γ E132) α -helix, který je přerušen neuspořádanou smyčkou mezi aminokyselinami γ Y68- γ M78 a C-terminální FReD (aminokyseliny γ T149- γ G388) (Sovová *et al.*, 2020).

N-konce řetězců A α , B β a γ jsou orientovány vůči sobě. C-koncové FReD domény B β a γ jsou na okrajích fibrinogenu, zatímco C-konec řetězce A α se zatačí zpět směrem k N-konci. N-terminální a C-terminální oblasti fibrinogenu jsou spojeny trojitou šroubovitou spojnici, které jsou na svém konci stabilizovány disulfidovými můstky (Medved *et Weisel*, 2009). Po sestavení je molekula fibrinogenu glykosylována v polohách B β N364, γ N52, popřípadě A α N667 (Sovová *et al.*, 2020).

C-konce A α řetězců, nazývané jako α C, obsahují asi 400 aminokyselin (207-610), tím tvoří 27 % celé molekuly (Protopopova *et al.*, 2015). Oblast α C se skládá ze dvou strukturně odlišných částí. Jedna část je COOH-terminální (rezidua A α 392-610), která obsahuje nezávisle složenou kompaktní doménu. Druhá část je NH₂-koncová (rezidua A α 221-391), jenž tvoří flexibilní pouto spojující tuto doménu s velkou částí molekuly. Proto se kompaktní část označuje jako α C-doména a flexibilní část jako α C-konektor (Medved *et Weisel*, 2009). α C-domény interagují intramolekulárně, ale také s centrální oblastí E přes N-konce řetězce B β . Dvě domény α C se otevírají směrem ven po štěpení FpB, a tím odhalují nová místa pro vazbu PLG, tPA a α 2-antiplazminu. Tato volná místa jsou také dostupná pro samoasociaci α C-domén do α C-polymerů vytvořením vodíkových můstků pomocí jejich N-terminálních subdomén prostřednictvím β -vlásenky. Tato struktura je potom posílena interakcí jejich C-koncovými subdoménami s α C-konektory, což zajistí správnou orientaci pro účinné zesíťování FXIII (Soria *et al.*, 2019). Struktura fibrinogenu je znázorněna na (Obr. 4).

3.3 SYNTÉZA

Molekula fibrinogenu se skládá ze dvou kopií tří polypeptidů, a to $A\alpha$, $B\beta$ a γ , které se skládají do funkčního hexameru. Tyto tři řetězce jsou kódovány třemi geny, FGA, FGB a FGG, seskupenými v oblasti 65 kilobází na lidském chromozomu 4 (4q23-q32) (Fort et al., 2010).

Biosyntéza fibrinogenu probíhá v hepatocytech, kde tyto tři geny podléhají koordinované transkripci. Geny FGA a FGG jsou transkribovány za vzniku dvou transkriptů. Hlavní transkript kódující $A\alpha$ je transkribován z pěti exonů, ale alternativní transkript, který je výsledkem sestřihu šestého exonu, kóduje minoritní izoformu, což je řetězec $A\alpha E$, který je přítomen v 1-3 % cirkulujících molekul fibrinogenu (De Moerloose et al., 2013). Pro FGG je hlavní řetězec γ transkribován z deseti exonů, zatímco v minoritním γ' řetězci je intron devět zachován. Dochází k substituci čtyř aminokyselin kódovaných exonem deset s dvaceti γ' COOH-terminálními rezidui. Γ'/γ a γ'/γ' představují 8-15 % celkového fibrinogenu (Vilar et al., 2020).

Fibrinogenové mRNA jsou translatovány do vznikajících polypeptidů se signálními peptidy, které jsou štěpeny v lumen endoplazmatického retikula (ER). Zde se řetězce spojují za pomoci chaperonů, nejprve $A\alpha$ - γ a $B\beta$ - γ dimery a poté jako trimerní po přidání chybějícího řetězce. NH₂-terminální disulfidické můstky spojují dva trimery produkující hexametrické molekuly. Ty procházejí do Golgiho aparátu, kde probíhají konečné kroky N-glykosylace $B\beta$ a γ řetězců. Správně vytvořený fibrinogen je vylučován jako 340 kDa glykoprotein (De Moerloose et al., 2013; Vilar et al., 2020).

Geny fibrinogenu jsou regulovány jak pro bazální expresi, tak i při reakci akutní fáze vyvolané zánětem, kdy zvýšená exprese tří genů je zprostředkována elementy citlivými na interleukin-6, které jsou uloženy v promotorových oblastech všech tří genů. Ta vede k okamžitému zvýšení hladiny fibrinogenu v plazmě (Fort et al., 2011). Každý fibrinogenový gen je regulován proximálním promotorem a lokálními posilujícími prvky, a to CNC12, PFE2, E3 a E4. Tyto regulační sekvence váží běžné transkripční regulátory a jsou vymezeny aktivními chromatinovými histonovými markery v buňkách exprimujících fibrinogen (Espitia et al., 2018).

3.4 VAZBA S TROMBOCYTY

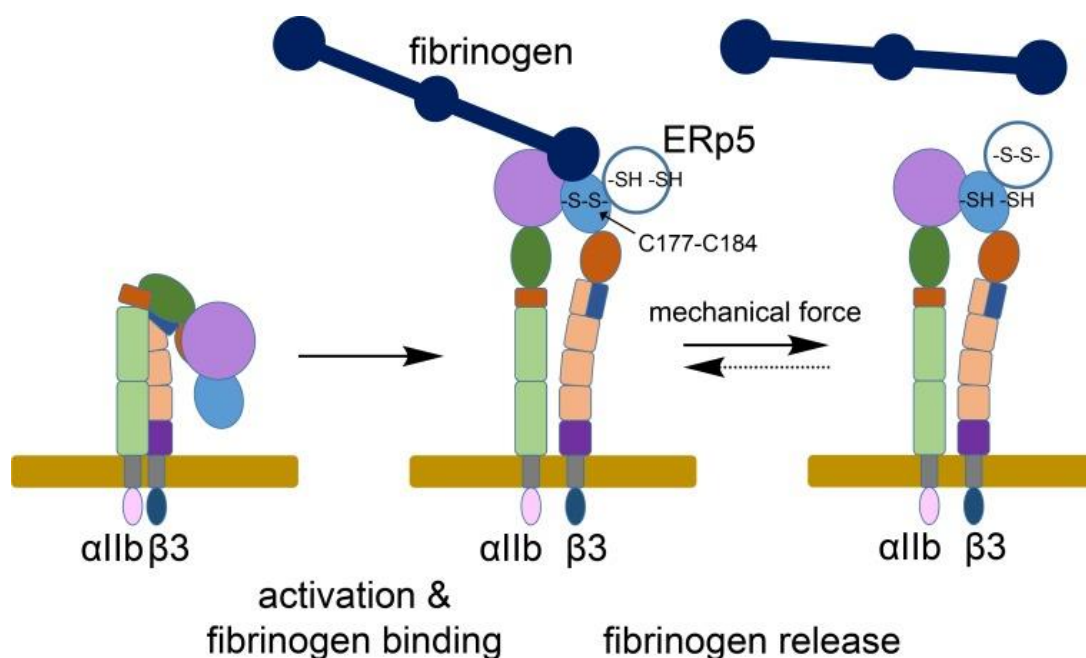
Krevní destičky jsou bezjaderné buňky, které mají velmi důležitou roli v hemostáze za fyziologických i patologických podmínek. Jsou rozhodující pro udržení integrity cévního systému a jsou v první obranné linii při krvácení. Při styku se subendoteliální matricí, která je odhalena při poškození cévy, krevní destičky na ni přilnou, aktivují se a začnou se vázat k ostatním destičkám, což vede k agregaci. Během aktivace trombocytů se fibrinogen váže na svůj specifický trombocytární receptor, glykoprotein, GPIIb/IIIa, známý také jako integrin α IIb β 3, čímž se zkompletuje finální cesta agregace trombocytů (*Hsia et al., 2018*).

Integriny jsou superrodinou buněčných povrchových receptorů. Jsou to heterodimerní transmembránové glykoproteinové komplexy sestavené z nekovalentně vázaných α a β podjednotek. Každá z podjednotek se skládá z velké N-terminální extracelulární ektodomény, z jednoduché helix šroubovice a z krátké C-terminální cytoplazmatické domény o velikosti 20-60 aminokyselin. Tato část, označovaná jako dokovací, poskytuje signalizaci pro cytoskeletální proteiny, které se účastní přenosu signálu jak zevnitř-ven, tak i zvenčí-dovnitř buňky. Integriny jsou hojně distribuovány v savčích tkáních a jsou udržovány ve stavu schopném adheze v mnoha typech buněk. Pro krevní destičky je ale velmi důležité mít akutnější a dynamičtější regulaci afinity integrinů a vazby na ligandy prostřednictvím signalizace zevnitř-ven, aby byla kontrolována buněčná funkce. Ačkoli krevní destičky exprimují řadu integrinů, včetně $\alpha_2\beta_1$ (kolagen), $\alpha_5\beta_1$ (fibronectin), $\alpha_6\beta_1$, tak specifický integrin α IIb β 3 je nejvíce exprimován a velmi přísně regulován. Destičky mají na svém povrchu až 80 000 integrinů α IIb β 3 a v případě potřeby mohou ze svých zásob mobilizovat další (*Durrant et al., 2017*).

Fibrinogen má vazebná místa pro destičky v C-koncové oblasti každého γ řetězce. Hexamerní struktura fibrinogenu se totiž vytvoří, když jsou dva $\alpha\beta\gamma$ monomery spojeny dohromady v N-terminální oblasti pomocí disulfidických můstků, takže C-terminální oblasti jsou daleko od sebe. Toto uspořádání zajišťuje právě vazbu destiček na C-konci γ -řetězce, kde mají volný přístup. Tím, že je fibrinogen poměrně velký, 330 kDa, vazebná místa pro krevní destičky jsou daleko od sebe, což snižuje sterickou zábranu. Jelikož je fibrinogen v plazmě přítomen ve vysoké koncentraci, tak se aktivované destičky naváží na fibrinogen poměrně rychle (*Horbett, 2018*).

Passam a et al. ve své studii zkoumali, jak se integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ odpojuje od fibrinogenu. Jejich výzkum ukázal, že za to může enzym Erp5, oxidoreduktáza uvolňována z krevních destiček po jejich aktivaci nebo ze stěn krevních cév. Tento enzym je navázaný na β_3 podjednotce $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Erp5 spouští štěpení disulfidu β_1 domény Cys177-Cys184, což vede k uvolnění fibrinogenu z $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Obr. 5) (*Passam et al., 2018*).

Stejně jako se fibrinogen váže na krevní destičky a napomáhá tím srážení krve, tak se může podílet i na zánětlivé odpovědi organismu, kdy se váže na adhezní receptory leukocytárních buněk. Integriny $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, Mac-1) a $\alpha_X\beta_2$ (CD11c/CD18, p150, 95) jsou hlavními fibrinogenovými receptory exprimovaných na neutrofilech, monocitech a makrofázích. Místo pro vazbu $\alpha_M\beta_2$ na fibrinogen je opět na C-terminální části γ -řetězce (*Ugarova et Yakubenko, 2001*).



Obr. 5: Vazba fibrinogenu a $\alpha\text{IIb}\beta_3$

*Aktivace integrinu $\alpha\text{IIb}\beta_3$ vede ke změně konformace z ohnuté na rozšířenou s vysokou afinitou, kdy může vázat ligand, fibrinogen. Erp5 následně štěpí disulfidickou vazbu v místě Cys177-Cys184 domény β_1 , která je zde znázorněna jako světle modrá ovál (*Passam et al., 2018*).*

3.5 FIBRINOGEN JAKO PROTEIN AKUTNÍ FÁZE

Proteiny akutní fáze (PAF) jsou plazmatické proteiny vylučované hlavně játry v reakci na změny v homeostáze. Může to být důsledek poranění, infekce nebo nádorového růstu. Předpokládá se, že syntéza PAF je nejakutnější obranná linie po poranění, předtím než se začnou syntetizovat specifické protilátky. Zvýšená hladina PAF má za následek snížení aktivity tkáňových proteáz zvýšenou syntézou inhibitorů proteináz. Dalším následkem je snížení hemoragického poškození zvýšenou aktivitou koagulačních faktorů, zlepšené odstraňování cizorodých látek prostřednictvím zvýšených hladin vazebných proteinů a potlačení zánětu (*Liu et Ukomadu, 2008*).

U všech druhů savců jsou PAF uvolňovány z jater do systémové cirkulace působením různých prozánětlivých cytokinů, jako je interleukin (IL) 6, IL-1 nebo TNF- α . Na základě exprese vyvolané cytokiny na játrech lze rozlišit dvě odlišné třídy PAF. PAF třídy I jsou regulovány hlavně IL-1 nebo kombinací IL-1, IL-6 a glukokortikoidy. Patří sem haptoglobin, C-reaktivní protein (CRP), sérový amyloid A, α -1 kyselý glykoprotein a hemopexin. PAF třídy II jsou regulovány výhradně IL-6 a glukokortikoidy. Do této třídy patří fibrinogen, α -1 antichymotrypsin a α -1 antitrypsin (*Arellano-Orden et al., 2017*).

Rychlost sedimentace erytrocytů (RSE) a CRP jsou v současné době nejvíce využívané markery akutní fáze v klinické praxi. RSE se mění v reakci na hladiny fibrinogenu v plazmě a viskozitu plazmy. RSE měří vzdálenost, kterou spadl vertikální sloupec antikoagulované krve za jednu hodinu. Zvýšenou RSE mohou způsobit jednak zánětlivé stavy, ale také anémie, těhotenství, drogy nebo obezita. U pacientů s chronickou renální insuficiencí a nefrotickým syndromem může být RSE zvýšena až na 60 mm/hod, přičemž fyziologická hodnota se pohybuje okolo 8 mm/hod, záleží na věku a pohlaví. RSE stoupá během 24-48 hodin od začátku zánětu a pomalu začne klesat s ústupem zánětu. Naopak mezi příčiny, které snižují hladinu RSE, patří polycytémie, poruchy erytrocytů, nízká hladina fibrinogenu nebo závažné onemocnění jater (*Markanday, 2015*).

Nadbytek živin vede k nerovnováze buněčných a molekulárních mediátorů imunity a zánětu. Ty mohou řídit metabolickou dysfunkci a spouštět hyperkoagulační stav, kdy mezi hlavní zvýšené složky patří fibrinogen, který se podílí na patologii obezity. Hladina fibrinogenu je u obézních pacientů s diabetem typu II vyšší, navíc dochází k hustší tvorbě sraženin, které jsou odolnější vůči fibrinolýze. Plazmatická hladina fibrinogenu koreluje s hladinou inzulinu nalačno. U zdravých jedinců infuze inzulinu

snižuje biosyntézu fibrinogenu, ale při inzulinové rezistenci může docházet k hyperfibrinogenemii (Vilar *et al.*, 2020).

Kromě tohoto se fibrinogen může účastnit jako mediátor antimikrobiální obrany hostitele. Slouží jako časná obranná linie pro ochranu hostitele tím, že zamezí růstu bakteriím, potlačí šíření mikrobů do vzdálenějších míst a zprostředkovává zabíjení hostitelských bakterií. K obraně hostitele, která je zprostředkována fibrinogenem, dochází dvěma způsoby. Za prvé rozpustný fibrinogen nebo fibrinové matrice fyzicky zachytí bakterie nebo zapouzdří bakteriální ložiska v infikované tkáni, čímž se omezí růst a šíření. Za druhé fibrin může podporovat aktivaci imunitních buněk hostitele, které eliminují a napadají mikroby (Ko *et al.*, 2016). Hexamer fibrinogenu může také inhibovat růst hub, nejspíše v důsledku interakce fibrinogen-cílový receptor. Problém je v tom, že po vytvoření komplexu $\alpha_M\beta_2$ /TLR4/FCP, který se účastní inhibice růstu hub, dochází k alergické přecitlivělosti a k neutrofilii. Proto je reakce fibrinogen-houby a fibrinogen-bakterie stále ve fázi výzkumu (Vilar *et al.*, 2020).

3.6 LABORATORNÍ STANOVENÍ FIBRINOGENU

Laboratorní testy fibrinogenu se vyvíjely s progresem laboratorních technologií. Předěšlé metody se spoléhaly na vizuální detekci tvorby precipitátu pozorovatelem nebo na hmotnost vytvořené sraženiny. Moderní technologie dnes využívají světelnou propustnost, absorpenci nebo mechanické koncové body pro detekci tvorby sraženiny na automatizovaných koagulometrech nebo stanovení pomocí viskoelastických vlastností plné krve. Počátky současného stanovení fibrinogenu se datují od Hammarstenova důkazu schopnosti trombinu vytvářet fibrin z jakéhokoli roztoku, který obsahoval fibrinogen. Tento postup se stále používá v běžně prováděných stanoveních fibrinogenu. Laboratorní techniky se vyvíjely souběžně s pochopením tvorby fibrinu z fibrinogenu. V 19. století se doporučovala separace plazmy a fibrinogenu, protože se předpokládalo, že ne všechny fibrinogen se přeměnil na fibrin. Pozdější zjištění, že veškerý fibrinogen může být převeden na fibrin, posunulo měření fibrinogenu ke kvantifikaci celkového fibrinu. Z počátku byla použita hmotnost vytvořených sraženin a následná extrapolace na množství nativního fibrinogenu (Besser *et al.*, 2016).

Dostupné testy pro stanovení fibrinogenu sahají od gravimetrických metod promývaných sraženin a srážecích proteinů až po vysoce automatizované robotické

analyzátořy. Gravimetrické testy jsou technicky i časově náročné a nevhodné pro stanovení většího počtu vzorků séra. Pokud je vyžadováno rychlé stanovení koncentrace fibrinogenu, jsou upřednostňovány testy, jako je Claussův nebo test fibrinogenu odvozený od protrombinového času (PT-Fg). I přes několikaleté používání v nemocničních laboratořích zůstává Claussův test a PT-Fg jako nejčastěji používané (*Enk et al, 2019*).

3.6.1 CLAUSSOVA METODA

Do zředěné testované plazmy se přidá vysoká koncentrace trombinu, v rozmezí 35-200 U/ml, nejčastěji ale 100 U/ml, a měří se jeho doba srážení. Použitím vyšší koncentrace trombinu se zjišťuje, že doba srážení je nezávislá na koncentraci trombinu v širokém spektru hladin fibrinogenu. Výsledky testu se porovnají s kalibrační křivkou připravenou srážením série ředící řady referenčního vzorku plazmy o známe koncentraci fibrinogenu a získá se výsledek v g/l. V této metodě musí být nastaven vhodný rozsah ředění a kalibrační křivka musí být lineární. Musí zahrnovat tři, nejlépe pět bodů ředění plazmy a provádí se v duplikátu. Při nesprávném lineárním rozsahu se musí testovaná plazma znovu naředit a proměřit (*Skornova et al., 2021*).

Tato metoda je časově náročná a vyžaduje značný stupeň technické odbornosti. Při manuálním provedení je velmi obtížné určit koncový bod, jelikož vzorky obsahují křehké a rozpadající se sraženiny. Mechanické metody závisejí na pevnosti sraženiny, a přestože jsou velmi citlivé na nízké koncentrace fibrinogenu, jsou ovlivněny heparinovou terapií. Z tohoto důvodu by se tento test neměl provádět na vzorcích odebraných do čtyř hodin po podání terapeutických dávek nefrakcionovaného heparinu nebo na vzorcích odebraných z heparinem kontaminovaných žil nebo artérií. Při mechanických metodách se měření času zahájí po přidání trombinového činidla do vzorku plazmy a zastaví se, když se kovová kulička začlení do fibrinové sítě. Tím se přeruší kontakt s magnetickým senzorem. Fotooptické systémy závisí na změně optické hustoty vyplývající z tvorby fibrinu, která snižuje propustnost světla a zvyšuje rozptýlené světlo. Nejvíce jsou ovlivněny zakalenou nebo lipemickou plazmou, žlučovým pigmentem nebo volným hemoglobinem (*Enk et al., 2019*).

Provádění Claussových testů fibrinogenu pomocí plně automatizovaných koagulometrů v rutinních klinických laboratořích může snížit množství stanovení pouze

na PT a APTT. Standardní plazma nebo kalibrant musí být vybírány pečlivě, protože zakalené plazmy mohou vést k nesprávnému přiřazení účinnosti, zejména u vzorků s nízkými hladinami fibrinogenu, když se provádějí jednobodové testy (*Mackie et al., 2003*).

3.6.2 STANOVENÍ FIBRINOGENU ODVOZENÉHO OD PT ČASU

Široce používaná metoda PT-Fg má tu výhodu, že poskytuje výsledky měření PT i fibrinogenu. Tento test není přímým stanovením plazmatického fibrinogenu, a proto je důležitý výběr kalibrantu nebo standardu. Tato metoda je založena na principu stanovení PT, kdy se fibrinogen přeměňuje na fibrin a zákal plazmy je přímo úměrný koncentraci fibrinogenu, která je vypočtena metodou koncového bodu nebo rychlosti. Výsledky se pak vynesou do grafu. (*Miesbach et al., 2010*). Metody kalibrace se mohou lišit dle výrobce, kalibrace může být jedno nebo vícebodová a plazma může být čerstvá nebo lyofilizovaná. Tyto uvedené důvody mohou vést k nesrovnalostem s výsledky Claussovy metody. Testy PT-Fg se nedoporučují pro obecné použití v hematologických laboratořích, jelikož jak analyzátor, tak i jednotlivá činidla ovlivňují hodnoty PT-Fg (*Mackie et al., 2003*).

3.6.3 IMUNOLOGICKÉ STANOVENÍ

Pro stanovení fibrinogenu existuje řada imunologických metod, jako je enzymatická imunoanalýza (ELISA), radiální imunodifuze a elektroforetické techniky. Dohromady tyto metody poskytují srovnatelné výsledky (*Skornova et al., 2021*). Nevýhodou těchto metod je, že jsou časově náročné, ale na druhou stranu metoda, jako je ELISA, má nejvyšší přesnost. Další nevýhodou je, že všechny tyto metody měří spíše samotnou koncentraci proteinu než jeho funkční aktivitu. U některých metod, kde jsou přítomny degradované formy fibrinogenu, mohou vycházet falešné výsledky, jelikož tyto produkty mají jinou antigenicitu a mohou migrovat různou rychlostí v imunodifuzních a elektroforézních technikách.

Některé testy využívají monoklonální protilátky namířené proti koncovým oblastem molekuly fibrinogenu. Tím se detekují intaktní nebo specificky degradované

molekuly fibrinogenu. Tyto metody se využívají spíše ve výzkumu než v nemocničních laboratořích (Mackie et al., 2003).

Ve studii Xiang et al. porovnávali koncentrace fibrinogenu stanovené Clauss metodou, PT-Fg a ELISA metodou. Tohoto výzkumu se zúčastnilo 73 pacientů s vrozenou disfibrinogenemií a bylo provedeno 81 fyziologických kontrol. Když srovnávali jednotlivé koncentrace, tak podle Claussovy metody byly koncentrace fibrinogenu výrazně nižší u pacientů s vrozenou disfibrinogenemií než u běžných kontrol. Ovšem poměr koncentrace fibrinogenu Pt-Fg/Clauss ukázal, že jsou hodnoty vyšší. U běžných kontrol byly koncentrace fibrinogenu měřené Claussovou metodou nepatrně nižší, ale jak prostřednictvím PT-Fg, tak i prostřednictvím Claussovy metody byly ve fyziologickém rozmezí (Tab. 1). Střední hodnota fibrinogenového antigenu naměřená metodou ELISA byla u běžných kontrol $3,89 \pm 0,57$ g/l, což jsou mírně vyšší hodnoty než u Claussovy metody, ale s metodou PT-Fg jsou téměř totožné. U pacientů s vrozenou dysfibrinogenemií byla naměřená hodnota $3,64 \pm 0,68$ g/l, což je opět obdobné s PT-Fg, ale hodnoty naměřené Claussovou metodou jsou výrazně nižší.

Tab. 1: Srovnání koncentrací fibrinogenu (Xiang et al., 2018).

Group	n	PT-derived method (g/l)	Clauss method (g/l)	t	P	Fibrinogen PT-derived/Clauss ratio
Congenital dysfibrinogenemia	73	3.70 ± 0.88	0.62 ± 0.19	32.948	<.001	6.24 ± 1.43
Normal control	81	3.95 ± 0.66	3.56 ± 0.70	11.262	<.001	1.11 ± 0.11

Koncentrace fibrinogenu měřené Claussovou metodou byly u pacientů s dysfibrinogenemií výrazně nižší než za použití PT-Fg. Tyto výsledky se ale shodují i s dalšími studiemi, kdy Llamas et al. nebo Miesbach et al. použili Claussovu metodu pro měření koncentrací fibrinogenu u pacientů s podezřením na dysfibrinogenemii. U některých pacientů toto onemocnění definitivně diagnostikovali. Právě u těchto pacientů byly hodnoty koncentrací měřené Claussovou metodou výrazně nižší než u PT-Fg. Pokud se ke stanovení koncentrací fibrinogenu používá Claussova metoda, dochází k prodloužení koagulace plazmy, což vede ke sníženým hodnotám koncentrací fibrinogenu a mylně může docházet k jiným diagnózám. Proto by se pro diagnózu kongenitální disfibrinogenemie měla používat jak Claussova metoda, tak i PT-Fg (Xiang et al., 2018).

3.7 LÉČBA FIBRINOGENEM

Za posledních 100 let došlo k výraznému posunu v transfuzním lékařství. Důležitou součástí je posun od používání plné krve k používání specifických krevních složek, jako jsou erytrocyty nebo trombocyty, a k používání purifikovaných, virem inaktivovaných produktů získaných z plazmy, jako jsou koncentráty faktorů. Toto umožnila práce Edwina Josepha Cohna, který objevil, že jednotlivé složky plné krve lze oddělit pomocí procesu frakcionace, který je označován jako „Cohnova frakcionace“. Následně v roce 1947 popsal šest hlavních frakcí plazmy, přičemž frakce I obsahovala nejvíce fibrinogenu (*Costa-Filho et al., 2016*).

Standartní léčbou krvácejících pacientů s vrozeným deficitem fibrinogenu je substituce fibrinogenu cílená na plazmatickou hladinu fibrinogenu 100-150 mg/dl (*Lissitchkov et al., 2020*). Fibrinogen se podává buď „na požádání“, pokud jde o akutní krvácení, nebo chirurgicky „jako profylaxe“ u pacientů s afibrinogenemií trpících závažným opakovaným krvácením, nebo jako prevence před výskytem krvácení (*Undas et Casini, 2019*). Existují tři možnosti suplementace fibrinogenu, a to čerstvě zmraženou plazmou, kryoprecipitátem nebo koncentrátem fibrinogenu. Každý z těchto suplementů má odlišnou přípravu, ale i jiný obsah fibrinogenu (*Collins et al., 2014*).

3.7.1 KONCENTROVANÝ FIBRINOGEN

Koncentrát fibrinogenu byl poprvé schválen 4. března 1963 pro použití v Brazílii. V Evropě k tomu dochází o tři roku později, a to 4. ledna 1966, kdy byl tento přípravek schválen německým federálním ministerstvem zdravotnictví (*Costa-Filho et al., 2016*). Koncentrát se vyrábí ze spojené lidské plazmy pomocí Cohn/Oncleyho precipitačního postupu. Koncentrace fibrinogenu je standardizovaná. Přípravek je uchován ve formě lyofilizovaného prášku při pokojové teplotě a může být rychle rekonstituován se sterilní vodou (*Rahe-Meyer et Sørensen, 2011*). Infuzní objemy jsou malé, což umožňuje rychlé podání bez prodlev po rozmrazení nebo po křížové zkoušce. Na rozdíl od FFP nebo kryoprecipitátu se do výrobního procesu fibrinogenového koncentrátu běžně zařazují kroky inaktivace viru expozicí rozpouštědla/detergentu nebo pasterizací. Tímto se minimalizuje riziko virového přenosu (*Fenger-Eriksen et al., 2009*). Koncentrát

fibrinogenu nabízí oproti kryoprecipitátu vyšší čistotu, přesnější dávkování, snížení alergických reakcí a větší bezpečnost (*Ross et al., 2018*).

Koncentrát fibrinogenu se považuje za hlavní základ léčby u pacientů s vrozenou afibrinogenemií, při které dochází ke krvácivým poruchám. Také se používá jako sekundární profylaxe, a to v případech kdy dochází k potenciálně život ohrožujícímu krvácení s vysokým rizikem recidivy. Stále častěji se začal využívat u pacientů se získanou hypofibrinogenemií. Nedostatek fibrinogenu se může objevit v případě masivní transfuze v souvislosti se ztrátou a ředěním koagulopatie, jelikož primární náhrada krystaloidy, koloidy a červenými krvinkami se provádí téměř výhradně bez plazmy. V takových situacích je fibrinogen, kvantitativně nejvíce zastoupený koagulační faktor, prvním prokoagulačním faktorem, který klesá na kritickou úroveň 1,5 g/l (*Franchini et Lippi, 2012*). V současné době jsou dispozici čtyři druhy koncentráту fibrinogenu. Prvním je Haemocomplettan (CSL Behring, Marburg, Německo), dalším je FIBRINOGENE T1a Clottagen (LFB, Les Ulis, Francie), třetím je Fibrinogen HT (Benesis, Osaka, Japonsko) a posledním druhem je FibroRAAS (Shangai, RAAS, Šangaj, Čína) (*Fenger-Eriksen et al., 2009*).

3.7.2 ČERSTVĚ ZMRAŽENÁ PLAZMA (FFP)

Plazma se začala v nemocnicích ve větším množství využívat během 20. a 30. let 20. století. Zpočátku se používala čerstvá plazma, později se přišlo na to, že sušená i zmrazená plazma je stejně účinná, a navíc se lépe skladuje. Toho se začalo hojně využívat během 2. světové války, kdy se sušená plazma využívala jako krevní náhrada. Po 2. světové válce se FFP začala používat i pro léčbu anémií nebo léčbu akutní lymfoblastické leukémie (ALL). Tato metoda se ovšem v léčbě ALL neosvědčila. Od roku 1964 se FFP začala využívat pro lékařské potřeby, které známe dodnes (*Puetz, 2013*).

FFP je alogenní produkt, který vyžaduje kompatibilitu příjemce-dárce v AB0 systému a před podáním se musí rozmrazit. Průměrná koncentrace fibrinogenu ve FFP je 2,5 g/l. Infuzní objemy jsou tedy poměrně vysoké. Transfuze je pomalá a existuje zde nepatrné riziko přetížení tekutinami (*Rahe-Meyer et Sørensen, 2011*). FFP je lidská plazma, která je získávána z dárcovství. Obsahuje velké množství proteinů, včetně prokoagulačních faktorů, jako je fibrinogen a faktory II, V, VII, VIII, IX, X a XI.

Obsahuje také antikoagulanty, jako je protein C, protein S a antitrombin (*Desborough et Stanworth, 2012*). Dále obsahuje vysoké množství imunoglobulinů a proteinů akutní fáze. Všechny tyto složky jsou přítomny v koncentracích mírně nižších nebo rovných vůči fyziologické hodnotě. V klinické praxi se nejčastěji využívá k léčbě předpokládané koagulopatie u krvácejícího pacienta. Největším problémem FFP je možný přenos infekčních agens do těla pacienta, proto se FFP dává, buď pod ultrafialové světlo, nebo se využívá methylenové modře (*Desborough et al., 2015*).

Velikost dávky FFP u dospělých jedinců bývá 1-2 jednotky, kdy jednotkou je myšleno množství plazmy izolované z jednotky plné krve darované od jednoho dárce. Typický objem jednotky FFP je 200 ml (*Puetz, 2013*).

3.7.3 KRYOPRECIPITÁT

Kryoprecipitát (CRYO) je směsný lidský krevní produkt získaný prostřednictvím centrifugace lidské plazmy. Vyrábí se rozmrazováním čtyř nebo šesti jednotek FFP při teplotě 4 °C. Alternativně se může připravit i z plazmy, která se zmrazí do 24 hodin po odběru (Fp24) (*Nascimento et al., 2014*). CRYO obsahuje faktor VIII a fibrinogen (*Subramaniyan et al., 2017*). Dále obsahuje faktor XIII, vWF a fibronectin. Každá jednotka by měla obsahovat více než 80 IU faktoru VIII, 150 mg fibrinogenu a zhruba 5-20 ml plazmy. CRYO se skladuje zmrazený při teplotě -18 °C, před infuzí se musí rozmrazit a následně není vyžadována křížová zkouška ani test kompatibility (*Holocomb et al., 2013*). Ačkoli to vypadá, že CRYO obsahuje většinu fibrinogenu z plazmy, tak ve skutečnosti tvoří pouze 32 %, zbytek zůstává v kryosupernatantu.

CRYO se používá pro suplementaci fibrinogenu při získané hypofibrinogenemii a při krvácení po úrazech nebo operacích. Nepříznivým elementem je opět infekční agens, zejména pokud se CRYO podává od více dárců. Stejně jako u FFP se i tohoto přípravku využívá ultrafialového záření nebo methylenové modři (*Kamyžsek et al., 2020*). Nevýhodou využívání methylenové modři je, že snižuje hladiny koagulačních faktorů, přičemž fibrinogen je z nich nejcitlivější na vyčerpání (*Franchini et Lippi, 2012*).

4. PATOLOGIE

Vrozené poruchy fibrinogenu jsou heterogenní skupinou vzácných abnormalit, které jsou způsobené mutacemi v jednom ze tří genů kódujících jednotlivé polypeptidové řetězce fibrinogenu, umístěné na chromozomu čtyři. Doteď bylo zjištěno více jak 450 mutací na FGA, FGB a FGG genech, a z toho více jak 250 symptomatických. Nejčastějšími mutacemi, z 50-80 %, jsou jednoaminokyselinové missense mutace. Mezi další defekty, odpovědné za poruchy fibrinogenu, patří změny čtecího rámce prostřednictvím malých delecí nebo inzercí v kódující části genu, mutace v místě sestřihu a velké delece. Méně jak 5 % případů jsou genetické varianty nacházející se na 3' a 5' oblastech genu (*Undas et Casini, 2019*).

Poruchy fibrinogenu jsou klasifikovány podle funkčních a antigenních hladin fibrinogenu. Kvantitativní poruchy, také známé jako typ I, ovlivňují množství fibrinogenu v oběhu. Do této skupiny patří hypofibrinogenemie s hladinou fibrinogenu nižší než 1,5 g/l a afibrinogenemie, autozomálně recesivní onemocnění, a to je definováno úplným deficitem fibrinogenu. Kvalitativní poruchy, také známé jako typ II, ovlivňují kvalitu cirkulujícího fibrinogenu. Dysfibrinogenemie, autozomálně dominantní onemocnění, má hladiny antigenu fibrinogenu fyziologické, zatímco u hypodysfibrinogenemie jsou hladiny snižené (*Neerman-Arbez et Casini, 2018*).

Dědičná amyloidóza A α -řetězce fibrinogenu není součástí kongenitálních poruch fibrinogenu, jelikož výsledné koagulační testy nejsou ovlivněny (*Casini et al., 2018*).

4.1 AFIBRINOGENEMIE

Kongenitální afibrinogenemie je vzácná koagulopatie, projevuje se autozomálně recesivní dědičností s poměrem muži a ženy 1:1 (*Goyal et al., 2011*). Toto onemocnění je charakterizované absencí cirkulujícího fibrinogenu v důsledku homozygotní nebo složené heterozygotní mutace v jednom z fibrinogenových genů. První případ byl popsán u chlapce v roce 1920, ale první kauzální mutace byla identifikována o několik let později. Většina z nich jsou nulové mutace, tedy velké delece nebo mutace sestřihového místa. Missense mutace jsou většinou seskupeny v COOH-terminálních globulárních oblastech B β a γ řetězců (*Vilar et al., 2020*).

Klinická závažnost se u afibrinogenemie značně liší. Prvním projevem v 85 % je prodloužené krvácení z pupeční šňůry u novorozenců, ale až 60 % jedinců je asymptomatických (Goyal et al., 2011). Krvácení je hlavním příznakem i u dospělých jedinců. Přírozený průběh afibrinogenemie je obvykle spojován se spontánním a závažným krvácením, které postihuje všechny tkáně, jako je kůže, dutina ústní, urogenitální trakt, gastrointestinální trakt a centrální nervový systém. Právě spontánní intrakraniální krvácení je u pacientů nečastější příčinou úmrtí (Undas et Casini, 2019). Kromě toho je u pacientů pozorováno prodloužené hojení ran. Tvorba bolestivých kostních cyst a spontánní ruptury sleziny jsou pozorovány jenom ve výjimečných případech (Acharya et Dimichele, 2008). Zvláštní riziko hrozí těhotným ženám, kdy může docházet ke spontánním potratům v průběhu prvního trimestru těhotenství. Více jak 50 % žen s afibrinogenemií má dlouhotrvající silné menstruační krvácení, které vyžaduje hormonální léčbu (Malaquin et al., 2016). Paradoxně pacienti s afibrinogenemií mohou mít tromboembolické příhody spojené se substituční léčbou fibrinogenu nebo bez ní. Mezi nejčastější příhody patří ischemická cévní mozková příhoda (Undas et Casini, 2019).

V laboratorní diagnóze jsou časy PT a aPPT prodlouženy. Trombinový čas je také prodloužený (Tab. 2), je více citlivý než PT a aPTT pro kvantitativní a kvalitativní defekty fibrinogenu. Ten je nedetekovatelný jak funkčními (Claussův) testy, tak ani antigenními testy. Pomocí ELISA metody lze afibrinogenemii definovat jako neměřitelnou hladinu funkčního fibrinogenu spojenou se stopovým množstvím imunoreaktivního fibrinogenu (Vilar et al., 2020).

4.2 HYPOFIBRINOGENEMIE

Vrozená hypofibrinogenemie byla poprvé popsána v roce 1935. Je mnohem častější než afibrinogenemie a je často způsobena heterozygotními mutacemi genu fibrinogenu. Nositelé mutací, které způsobují deficit fibrinogenu, jsou v populaci zastoupeni 1:500. Hypofibrinogenemie je mnohdy asymptomatická a je diagnostikována náhodně, zejména pokud jsou u pacientů zjištěny hladiny fibrinogenu nižší než 1 g/l. U ostatních pacientů závisí hladina fibrinogenu na fenotypu krvácení (De Moerloose et al., 2013).

U 20 % pacientů se vyskytují spontánní krvácivé příhody, jako je silná menstruace, svalové hematomy a gastrointestinální krvácení. K tomuto dochází hlavně v případě,

pokud hladina fibrinogenu v plazmě nepřekročí 0,5 g/l. Stejně jako u afibrinogenemie, i zde je zvýšené riziko krvácení v průběhu těhotenství a poporodní krvácení. U vzácných podtypů hypofibrinogenemie se fibrinogenové agregáty mohou akumulovat v endoplazmatickém retikulu hepatocytů, a tím způsobit různě závažná onemocnění jater (*Undas et Casini, 2019*).

Většina koagulačních testů je variabilně prodloužena a opět je nejcitlivějším testem trombinový čas (*Acharya et Dimichele, 2008*).

4.3 DYSFIBRINOGENEMIE A HYPODYSFIBRINOGENEMIE

Kongenitální dysfibrinogenemie je kvalitativní vrozená fibrinogenová porucha charakterizovaná normálními hladinami fibrinogenového antigenu spojenými s nízkou funkční aktivitou (*Casini et al., 2015*). Přibližně 55 % pacientů je asymptomatických. Dále je 50-60 % pacientů diagnostikováno jako součást vyšetření, kdy mají prodloužený čas srážení krve nebo v případě, že byl v někdo v rodině již diagnostikován. Pouze 25 % nemocných má symptomy v podobě mírného krvácení. Vyšší riziko zase hrozí u těhotných žen, kdy může docházet k opakovaným spontánním potratům a poporodní trombóze (*Undas et Casini, 2019*).

Pacienti s dysfibrinogenemií krvácejí nejčastěji po traumatu, operaci nebo po porodu. Nejčastějším typem fibrinogenu, který způsobuje dysfibrinogenemii, je Dusartův fibrinogen, způsobený jedinou změnou báze (C x T) v genu A α -řetězce, vedoucí k substituci aminokyselin A α 554 Arg x Cys a následně k tvorbě velmi tenkých fibrinových vláken s vadnou vazbou na PLG (*De Moerloose et al., 2013*).

Klasický funkční test fibrinogenu poskytuje nízké hladiny ve srovnání s imunologickými testy, ale hladiny mohou být shodné a funkční hladiny mohou být normální. Proto je pro dysfibrinogenemii typický nesoulad mezi koagulabilním proteinem a imunologicky měřeným fibrinogenem. Zatímco hladiny antigenu stanovené radiální imunodifuzí a testy srážení teplem vykazují podobné hodnoty, tak mezi Claussovým testem a PT-Fg je pozorován jasný nesoulad (*Casini et al., 2015*). Dalším důkazem je prodloužený reptilázový čas (Tab. 2). Normální nebo zvýšený antigen s nižší funkční hladinou vedoucí k nízkému poměru funkčních antigenů je obvykle diagnostický.

Senzitivita koagulačních testů závisí na konkrétní mutaci, reagensích a technikách (Acharya et Dimichele, 2008).

Hypodysfibrinogenemie je nejčastěji hlášenou vrozenou poruchou fibrinogenu. Je spojena s příznaky charakteristickými pro hypofibrinogenemii a dysfibrinogenemii. Pokud tedy dojde k rozporu mezi sníženou hladinou antigenu fibrinogenu a sníženou aktivitou, měla by se vzít do úvahy hypodysfibrinogenemie. Velmi časté je poporodní krvácení a menstruační poruchy, proto je tento druh onemocnění nejčastěji popisován u symptomatických žen. Spontánní krvácení spojené s fibrinogenovými abnormalitami se obvykle vyskytuje při funkčním množství fibrinogenu 0,7 g/l (Undas et Casini, 2019).

Tab. 2: Laboratorní diagnostika (Casini et al., 2018).

	Afibrinogenemia	Hypofibrinogenemia	Dysfibrinogenemia*	Hypodysfibrinogenemia
Mandatory				
APTT	↑, infinitely prolonged	↑-N, depending on fibrinogen levels	↑-N	↑-N, depending on fibrinogen levels
PT	↑, infinitely prolonged	↑-N, depending on fibrinogen levels	↑-N	↑-N, depending on fibrinogen levels
Clauss	↓, undetectable	↓, proportional decrease	↓ and discrepant from PT derived for most variants‡	↓, disproportional decrease
Antigen Genotype	↓, undetectable		N†	
Additional if available				
Thrombin time	↑, infinitely prolonged	↑-N, depending on fibrinogen levels	↑-N	↑-N, depending on fibrinogen levels
Reptilase time	↑, infinitely prolonged	↑-N, depending on fibrinogen levels	↑-N	↑-N, depending on fibrinogen levels
PT-derived fibrinogen	↓, undetectable	↓, proportional to fibrinogen levels	N and discrepant from the Clauss method for most variants‡	NA

Tabulka by měla zahrnovat aPTT, PT a také funkční hodnocení hladiny fibrinogenu Claussovou metodou a měření antigenu. Trombinový čas a čas reptilázy jsou často prodlouženy. Následně by se měla provést genotypizace, aby se potvrdila diagnóza (Casini et al., 2018).

4.4 FIBRINOGEN A α -CHAIN AMYLOIDOSIS

Amyloidóza není jedním onemocněním, ale skupinou onemocnění, která zahrnují chybné ukládání proteinů v extracelulárních prostorech tkání, což vede k dysfunkci orgánů a potenciálně ke smrti. První případ amyloidózy A α -řetězce byl popsán v roce

1993. Je charakterizována nadměrným ukládáním amyloidu, hlavně v renálních glomerulech (Yazaki et al., 2018). Amyloidní fibrily jsou nerozpustné proteinové agregáty, které se tvoří, pokud dojde ke špatné tvorbě proteinu. Existuje 36 biochemicky odlišných proteinů, které způsobují amyloidózu (Chapman et Dogan, 2019). Společným znakem těchto proteinů je konformační změna, typicky zahrnující struktury β -listu. Amyloidóza A α -řetězce fibrinogenu (AFib) je vzácná autozomálně dominantní dědičná porucha vyplývající z mutace v jedné ze dvou kopií genu FGA. Dochází k mutaci v α C oblasti fibrinogenu, což vede k nesprávnému ukládání a tvorbě amyloidu. Faktor zvyšující amyloidózu a sérový amyloid A jsou elementy, které přispívají ke zvýšené tvorbě AFib tím, že se naváží na purifikovaný fibrinogen a vyvolají tvorbu amyloidu (Vilar et al., 2020).

Klinicky se AFib projevuje jako proteinurie, hypertenze a azotémie. V pokročilých případech amyloidózy lze pozorovat postižení jater a sleziny, nejvíce však ledvin. U některých pacientů může také docházet k ateroskleróze nebo kardiomyopatii, když se fibrinogen začne ukládat v cévních stěnách. Většina pacientů s amyloidózou A α -řetězce nemá žádnou rodinnou anamnézu renálního onemocnění (Yazaki et al., 2018). Pacienti s AFib nemají poruchy krvácení a při měření jsou časy srážení normální.

Léčba (AFib) spočívá v dialýze nebo v transplantaci ledvin či jater. Jelikož je fibrinogen produkován játry, mutovaná forma proteinu bude nadále produkována a ukládána, dokud nebude orgán transplantován (Chapman et Dogan, 2019).

Pro klinickou typizaci amyloidu je v dnešní době nejvíce využíván hmotnostní spektrometr (Vilar et al., 2020).

4.5 FIBRINOGEN A COVID-19

Pacienti s COVID-19 vykazují koagulační abnormality, nejčastěji zvýšenou hladinu fibrinogenu a D-dimerů, často s lehčí trombocytopenií. Pacienti mají v průměru zvýšenou hladinu fibrinogenu na 5-7 g/l (Eljilany et Elzouki, 2020). Zvýšený D-dimer je spojen s vyšší úmrtností. Část pacientů s COVID-19 může mít abnormálně krátké PT a aPTT. Zkrácený aPTT je často ve spojitosti se zvýšeným faktorem VIII jako odpověď akutní fáze. U vážněji postižených pacientů se může vyvinout stav obdobný diseminované intravaskulární koagulopatii (DIC) s mírně prodlouženým PT a aPTT, zatímco fibrinogen u těchto pacientů zůstává normální nebo je jenom lehce navýšený.

Mnohonásobně víc jsou však zvýšeny hladiny D-dimerů, neúměrně k jakýmkoli abnormalitám zjištěných v PT/INR, aPTT, hladině fibrinogenu nebo počtu krevních destiček, což je pro DIC neobvyklé, na rozdíl u DIC způsobené bakteriální sepsí (*Wool et Miller, 2021*).

Han et al. ve své studii zkoumali změny srážlivosti krve u pacientů s COVID-19 a porovnávali je se zdravými kontrolami. Bylo zřejmé, že hladina fibrinogenu a jeho degradačních produktů byla navýšena u pacientů s lehčím i těžším průběhem. Jelikož hodnoty fibrinogenu nemají vypovídající hodnotu o závažnosti onemocnění, měl by být vždy v případě COVID-19 stanovován společně s D-dimery (*Han et al. 2020*).

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zaměřit se a popsat jeden z nejhojněji se vyskytujících se glykoproteinů v plazmě, fibrinogen. Tomuto proteinu dal poprvé jméno Rudolf Virchow v roce 1847 a o několik let později, v roce 1879, Olof Hammarsten připravil první purifikovaný fibrinogenový preparát prostřednictvím NaCl.

Struktura fibrinogenu je tvořena třemi peptidovými řetězci, a to $A\alpha$, $B\beta$ a γ , které jsou syntetizovány geny FGA, FGB a FGG. Důležitou součástí struktury jsou C-konce $A\alpha$ řetězce, které se stáčí zpět směrem k centrální E oblasti a účastní se vazby s PLG nebo tPA. C-konce γ řetězce jsou významnou částí pro vazbu s krevními destičkami, které se na fibrinogen váží prostřednictvím receptoru $\alpha IIb\beta 3$, čímž může docházet k agregaci destiček.

Fibrinogen se také v těle účastní jako PAF a mezi ostatními koagulačními faktory je to jeden z prvních proteinů, u kterého můžeme zaznamenat změny hladiny. V současné době se provádějí výzkumy, zatím ještě na myších, který zkoumá změny hladin fibrinogenu v důsledku působení různých bakterií. Jelikož je fibrinogen jeden z prvních faktorů, u kterého dochází k deficitu, je důležité zajistit jeho substituci ať už ve formě FFP, nebo CRYO. Podstatnou roli hraje také lékařská prevence, aby se předešlo krvácení nebo trombotickým stavům. Při vyšetření by se vždy měla hlídat hladina fibrinogenu a také by se měla hlídat jeho funkční aktivita.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ACHARYA SS a DIMICHELE DM: Rare inherited disorders of fibrinogen. *Haemophilia*. **2008**, 14(6), 1151-1158.
2. ANTONIAK S: The coagulation system in host defense. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. **2018**, 2(3), 549-557.
3. ARELLANO-ORDEN E, CALERO-ACUÑA C, CORDERO JA et al.: Specific networks of plasma acute phase reactants are associated with the severity of chronic obstructive pulmonary disease: a case-control study. *International Journal of Medical Sciences*. **2017**, 14(1), 67-74.
4. BESSER M a MACDONALD S: Acquired hypofibrinogenemia: current perspectives. *Journal of Blood Medicine*. **2016**, 7, 217-225.
5. BERZELIUS JJ: *Traité de chimie*. Société typographique belge. **1838**, 608.
6. BROOS K, FEYS HB, DE MEYER SF et al.: Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. **2011**, 25(4), 155-167.
7. BROWN AC a BARKER TH: Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomaterialia*. **2014**, 10(4), 1502-1514.
8. CASINI A, BLONDON M, LEBRETON A et al.: Natural history of patients with congenital dysfibrinogenemia. *Blood*. **2015**, 125(3), 553-561.
9. CASINI A, UNDAS A, PALLA R et al.: Diagnosis and classification of congenital fibrinogen disorders: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2018**, 16(9), 1887-1890.
10. CESARMAN-MAUS, HAJJAR G, KA: Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. **2005**, 129(3), 307-321.
11. COLLINS PW, SOLOMON C, SUTOR K et al.: Theoretical modelling of fibrinogen supplementation with therapeutic plasma, cryoprecipitate, or fibrinogen concentrate. *British Journal of Anaesthesia*. **2014**, 113(4), 585-595.
12. COSTA-FILHO R, HOCHLEITNER G, WENDT M et al.: Over 50 Years of Fibrinogen Concentrate. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. **2016**, 22(2), 109-114.

13. DE MOERLOOSE P, CASINI A, NEERMAN-ARBEZ M: Congenital Fibrinogen Disorders: An Update. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. **2013**, 39(6), 585-595.
14. DENIS PS: Mémoire sur le sang considéré quand il est fluide, pendant qu'il se coagule et lorsqu'il est coagulé: suivi d'une notice sur l'application de la méthode d'experimentation par les sels a l'étude des substances albuminoïdes. **1859**, 208.
15. DESBOROUGH MJR, SANDU R, BRUNSKILL SJ, et al.: Fresh frozen plasma for cardiovascular surgery. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. **2015**, (8), 7.
16. DESBOROUGH M a STANWORTH S: Plasma transfusion for bedside, radiologically guided, and operating room invasive procedures. *Transfusion*. **2012**, 52, 20-29.
17. DIDIASOVA M, WUJAK L, WYGRECKA M et al.: From Plasminogen to Plasmin: Role of Plasminogen Receptors in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **2014**, 15(11), 21229-21252.
18. DOUGLAS S: COAGULATION HISTORY, OXFORD 1951-53. *British Journal of Haematology*. **1999**, 107(1), 22-32.
19. DURRANT TN, VAN DEN BOSCH MT, HERS I: Integrin α IIb β 3 outside-in signaling. *Blood*. **2017**, 130(14), 1607-1619.
20. ELJILANY I a ELZOUKI A-N: PD-Dimer, Fibrinogen, and IL-6 in COVID-19 Patients with Suspected Venous Thromboembolism. *Vascular Health and Risk Management*. **2020**, 16, 455-462.
21. ENK NM, KUTTER APN, KUEMMERLE-FRAUNE C et al: Correlation of plasma coagulation tests and fibrinogen Clauss with rotational thromboelastometry parameters and prediction of bleeding in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **2019**, 33(1), 132-140.
22. ESPITIA JC, FISH RJ, NEERMAN-ARBEZ M: Local chromatin interactions contribute to expression of the fibrinogen gene cluster. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2018**, 16(10), 2070-2082.
23. FENGER-ERIKSEN Ch, INGERSLEV J, SØRENSEN B: Fibrinogen concentrate – a potential universal hemostatic agent. *Expert Opinion on Biological Therapy*. **2009**, 9(10), 1325-1333.
24. FORT A, BOREL Ch, MIGLIAVACCA E, et al.: Regulation of fibrinogen production by microRNAs. *Blood*. **2010**, 116(14), 2608-2615.

25. FORT A, FISH RJ, ATTANASIO C, et al.: A liver enhancer in the fibrinogen gene cluster. *Blood*. **2011**, 117(1), 276-282.
26. FOURCROY A-F: Elements of natural history, and of chemistry: being the second edition of the elementary lectures on those sciences, first published in 1782, and now greatly enlarged and improved, by the author, M. de Fourcroy. **1788**, 4, 498.
27. FRANCHINI M a LIPPI G: Fibrinogen replacement therapy: a critical review of the literature. *Blood Transfus*. **2012**, 10(1), 23-27.
28. GALANAKIS D, SPITZER S, SCHARRER I: Unusual A alpha 16Arg→Cys dysfibrinogaemic family: absence of normal A alpha-chains in fibrinogen from two of four heterozygous siblings. *Blood Coagulation & Fibrinolysis. International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. **1993**, 4(1), 67-71.
29. GOYAL SS, SHENOY UK, BHARDWAJ DV et al.: Anaesthetic management of a child with congenital afibrinogenemia - A rare inherited coagulation disorder. *Indian Journal of Anaesthesia*. **2011**, 55(6), 605-607.
30. Han H, Yang L, Liu R, et al.: Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **2020**, 58(7), 1116-1120.
31. HOLOCOMB JB, FOX EE, ZHANG X et al.: Cryoprecipitate use in the PROMMTT study. *The journal of trauma and acute care surgery*. **2013**, 7, 31-39.
32. HORBETT TA: Fibrinogen adsorption to biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **2018**, 106(10), 2777-2788.
33. HSIA C-H, LU W-J, LIN K-H et al.: Norcantharidin, a clinical used chemotherapeutic agent, acts as a powerful inhibitor by interfering with fibrinogen–integrin α II b β 3 binding in human platelets. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **2018**, 22(4), 2142-2152.
34. CHANA-MUÑOZ A, JENDROSZEK A, SØNNICHSEN M et al.: Origin and diversification of the plasminogen activation system among chordates. *BMC Evolutionary Biology*. **2019**, 19(1), 27.
35. CHAPIN JC a HAJJAR KA: Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. **2015**, 29(1), 17-24.
36. CHAPMAN J a DOGAN A: Fibrinogen alpha amyloidosis: insights from proteomics. *Expert Review of Proteomics*. **2019**, 16(9), 783-793.

37. CHERNYSH IN, NAGASWAMI Ch, WEISEL JW: Visualization and identification of the structures formed during early stages of fibrin polymerization. *Blood*. **2011**, 117(17), 4609-4614.
38. CHINNARAJ M, PLANER W, POZZI N: Structure of Coagulation Factor II: Molecular Mechanism of Thrombin Generation and Development of Next-Generation Anticoagulants. *Frontiers in Medicine*. **2018**, 5, 281.
39. JENNEWEIN C, TRAN N, PAULUS P, et al.: Novel Aspects of Fibrin(ogen) Fragments during Inflammation. *Molecular Medicine*. **2011**, 17(5-6), 568-573.
40. JOHNSON ED, SCHELL JC, RODGERS GM: The D-dimer assay. *American Journal of Hematology*. **2019**, 94(7), 833-839.
41. KAMYSZEK RW, FOSTER MW, EYANS BA et al.: The effect of pathogen inactivation on cryoprecipitate: a functional and quantitative evaluation. *Blood Transfus*. **2020**, 18(6), 454-464.
42. KO Y-P a FLICK M: Fibrinogen Is at the Interface of Host Defense and Pathogen Virulence in *Staphylococcus aureus* Infection. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. **2016**, 42(04), 408-421.
43. KÖHLER S, SCHMID F, SETTANNI G et al.: The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. *PLOS Computational Biology*. **2015**, 11(9), 2-3.
44. KOLEV K a LONGSTAFF C: Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. **2016**, 175(1), 12-23.
45. KOŁODZIEJCZYK J a PONCZEK MB: The role of fibrinogen, fibrin and fibrin(ogen) degradation products (FDPs) in tumor progression. *Współczesna Onkologia*. **2013**, 2, 113-119.
46. LIM BCB, ARIËNS RAS, M CARTER AM, et al.: Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *The Lancet*. **2003**, 361(9367), 1424-1431.
47. LISSITCHKOV T, MADAN B, DJAMBAS KHAYAT C et al.: Fibrinogen concentrate for treatment of bleeding and surgical prophylaxis in congenital fibrinogen deficiency patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2020**, 18(4), 815-824.

48. LIU Z a UKOMADU Ch: Fibrinogen-like protein 1, a hepatocyte derived protein is an acute phase reactant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2008**, 365(4), 729-734.
49. MACKIE IJ, KITCHEN S, MACHIN SJ et al.: Guidelines on fibrinogen assays. *British Journal of Haematology*. **2003**, 121(3), 396-404.
50. MALAQUIN S, REIBIBO L, CHIVOT C et al.: Congenital afibrinogenemia: a case report of a spontaneous hepatic hematoma. *Medicine*. **2016**, 95(28), 1-3.
51. MANN KG, ORFEO T, BUTENAS S, et al.: Blood coagulation dynamics in haemostasis. *Hamostaseologie*. **2009**; 29(1), 7-16.
52. MARKANDAY A: Acute Phase Reactants in Infections: Evidence-Based Review and a Guide for Clinicians. *Open Forum Infectious Diseases*. **2015**, 2(3), 1-4.
53. MEDVED L a WEISEL JW: Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2009**, 7(2), 355-359.
54. MIESBACH W, SCHENK J, ALESCI S et al.: Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thrombosis Research*. **2010**, 126(6), 428-433.
55. MOSESSON MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2005**, 3(8), 1894-1904.
56. MORRISON PR, EDSALL JT, MILLER SG: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XVIII. The Separation of Purified Fibrinogen from Fraction I of Human Plasma. *Journal of the American Chemical Society*. **1948**, 70(9), 3103-3108.
57. NASCIMENTO B, GOODNOUGH LT, LEVY JH: Cryoprecipitate therapy. *British Journal of Anaesthesia*. **2014**, 113(6), 922-934.
58. NEERMAN-ARBEZ M a CASINI A: Clinical Consequences and Molecular Bases of Low Fibrinogen Levels. *International Journal of Molecular Sciences*. **2018**, 19(1), 192.
59. OLIVA MLV, DREVENY I, EMSLEY J: Exosites expedite blood coagulation. *Journal of Biological Chemistry*. **2020**, 295(45), 15208-15209.
60. PADMANABHAN K, WU TP, RAVICHANDRAN KG et al.: Kringle-kringle interactions in multimer kringle structures. *Protein Science*. **1994**, 3(6), 898-910.
61. PALTA S, SAROA R, PALTA A: Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia*. **2014**, 58(5) 515-523.

62. PASSAM F, CHIU J, JU L et al.: Mechano-redox control of integrin de-adhesion. *ELife*. **2018**, 7, 1-13.
63. POZZI N a DI CERA E: Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Review of Proteomics*. **2014**, 11(6), 653-655.
64. POZZI N, CHEN Z, GOHARA DW et al.: Crystal Structure of Prothrombin Reveals Conformational Flexibility and Mechanism of Activation. *Journal of Biological Chemistry*. **2013**, 288(31), 22734-22744.
65. PROTOPOPOVA AD, BARINOV NA, ZAVYALOVA EG et al.: Visualization of fibrinogen α C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2015**, 13(4), 570-579.
66. PUETZ J: Fresh frozen plasma: the most commonly prescribed hemostatic agent. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2013**, 11(10), 1794-1799.
67. RAHE-MEYER N a SØRENSEN B: Fibrinogen concentrate for management of bleeding. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2011**, 9(1), 1-5.
68. RIEDEL T, SUTTNAR J, BRYNDA E et al.: Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. *Blood*. **2011**, 117(5), 1700-1706.
69. RIJKEN DC a UITTE DE WILLIGE S: Inhibition of Fibrinolysis by Coagulation Factor XIII. *BioMed Research International*. **2017**, 1-6.
70. RIZZO K, VELLA K, ZAMMIT D et al.: Fibrinogen measurement in liver disease: validation of the functional fibrinogen thromboelastography assay and a novel mathematical predictive model. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, **2019**, 17(3), 237-246.
71. ROSS C, RANGARAJAN S, KARIMI M et al.: Pharmacokinetics, clot strength and safety of a new fibrinogen concentrate: randomized comparison with active control in congenital fibrinogen deficiency. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2018**, 16(2), 253-261.
72. SKORNOVA I, SIMURDA T, STASKO J et al.: Use of Fibrinogen Determination Methods in Differential Diagnosis of Hypofibrinogenemia and Dysfibrinogenemia. *Clinical Laboratory*. **2021**, 67 (4), 1029-1033.
73. SORIA J, MIRSHAHI S, MIRSHAHI SQ et al.: Fibrinogen α C domain: Its importance in physiopathology. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. **2019**, 3(2), 173-183.

74. SOVOVÁ Ž, ŠTIKAROVÁ J, KAUFMANOVÁ J et al.: Impact of posttranslational modifications on atomistic structure of fibrinogen. *PLOS ONE*. **2020**, 15(1), 1-3.
75. SUBRAMANIYAN R, MARWAHA N, JAIN A et al.: Factors affecting the quality of cryoprecipitate. *Asian Journal of Transfusion Science*. **2017**, 11(1), 33-39.
76. UGAROVA TP a YAKUBENKO VP: Recognition of Fibrinogen by Leukocyte Integrins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2001**, 936(1), 368-385.
77. UNDAS A a CASINI A: Congenital structural and functional fibrinogen disorders: a primer for internists. *Polish Archives of Internal Medicine*. **2019**, 129(12), 913-920.
78. URANO T, CASTELLINO FJ, SUZUKI Y: Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2018**, 16(8), 1487-1497.
79. VILAR R, FISH RJ, CASINI A et al.: Fibrin(ogen) in human disease: both friend and foe. *Haematologica*. **2020**, 105(2), 284-296.
80. VIRCHOW R: Der puerperale Zustand. Das Weib und die Zelle. *Virchow, Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. **1847**, 735-79.
81. WEISEL JW a LITVINOV RI: Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. **2013**, 121(10), 1712-1719.
82. WHELIHAN MF, ZACHARY V, ORFEO T et al.: Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*. **2012**, 120(18), 3837-3845.
83. WOOL GD a MILLER JL: The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology*. **2021**, 88(1), 15-27.
84. XIANG L, LUO M, YAN J et al.: Combined use of Clauss and prothrombin time-derived methods for determining fibrinogen concentrations: Screening for congenital dysfibrinogenemia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **2018**, 32(4), 1-2.
85. YAZAKI M, YOSHINAGA T, SEKIJIMA Y et al.: Hereditary Fibrinogen A α -Chain Amyloidosis in Asia: Clinical and Molecular Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*. **2018**, 19(1), 320.
86. ZHANG L, LONG Y, XIAO H et al.: Use of D-dimer in oral anticoagulation therapy. *International Journal of Laboratory Hematology*. **2018**, 40(5), 503-507.
87. ZHMUROV A, PROTOPOPOVA AD, LITVINOV RI et al.: Atomic Structural Models of Fibrin Oligomers. *Structure*. **2018**, 26(6), 857-868.

88. ZWIRZITZ A, REITER M, SKRABANA R et al.: Lactoferrin is a natural inhibitor of plasminogen activation. *Journal of Biological Chemistry*. **2018**, 293(22), 8600-8613.