

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Aktivace trombocytů po implantaci umělých materiálů
Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Platelet Activation After Implantation of Artificial Materials
Bachelor Thesis

2024

Lucie Petráčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Petráčková**
Osobní číslo: **C20388**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Aktivace trombocytů po implantaci umělých materiálů**
Téma práce anglicky: **Platelet Activation After Implantation of Artificial Materials**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracujte rešerši z odborné literatury zaměřenou na roli a aktivaci trombocytů po implantaci umělých materiálů. Zařaďte produkty trombocytů (chemokiny), hemostázu, principy a možnosti protidestičkové léčby.

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Science direct; odborné knihy.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Marcela Slovákova, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Aktivace trombocytů po implantaci umělých materiálů 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 14. 04. 2024

Lucie Petráčková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za její odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále bych poděkovala svým rodičům, Martině a Jiřímu Petráčkovým, za jejich podporu a motivaci během celého studia. Dále bych ráda poděkovala svému příteli Petrovi Weineltovi za jeho podporu, nejen při tvorbě této práce. Děkuji také Kateřině Lánské za její obrovskou pomoc během studia.

ANOTACE

Tato práce se zaměřuje na problematiku aktivace trombocytů v důsledku implantace umělých materiálů. Popisuje morfologii, strukturu a funkci trombocytů, včetně jejich interakce s imunitním systémem. Dále zkoumá úlohu chemokinů produkovaných trombocyty při aktivaci a jejich interakci s implantátem, včetně adsorpce bílkovin. Závěrečná část se zaměřuje na různé typy implantátů, včetně kardiovaskulárních implantátů jako jsou stenty a náhrady srdečních chlopní, a jejich specifický vliv na aktivaci trombocytů.

KLÍČOVÁ SLOVA

krvní destičky, chemokiny, aktivace destiček, implantáty

TITLE

Platelet Activation After Implantation of Artificial Materials

ANNOTATION

This thesis focuses on the issue of platelet activation due to the implantation of artificial materials. Describes the morphology, structure and function of platelets, including their interaction with the immune system. Furthermore, thesis investigates the role of chemokines produced by platelets in activation and their interaction with the implant, including protein adsorption. The final section focuses on different types of implants, including cardiovascular implants such as stents and heart valve replacements, and their specific effect on platelet activation.

KEYWORDS

platelets, chemokines, platelet activation, implants

OBSAH

| | |
|---|----|
| SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK..... | 10 |
| SEZNAM ZKRATEK | 11 |
| ÚVOD..... | 13 |
| 1 Krevní destičky | 14 |
| 1.1 Morfologie | 14 |
| 1.2 Funkce..... | 15 |
| 1.3 Tvorba..... | 17 |
| 1.4 Povrchové receptory | 19 |
| 1.5 Vnitřní struktura..... | 21 |
| 2 Chemokiny destiček..... | 24 |
| 2.1 CC chemokiny | 25 |
| 2.1.1 CCL2..... | 26 |
| 2.1.2 CCL5..... | 27 |
| 2.2 CXC chemokiny | 27 |
| 2.2.1 CXC chemokiny bez ELR motivu | 29 |
| 2.2.2 CXCL4..... | 29 |
| 3 Interakce krevních destiček s cizími materiály | 31 |
| 3.1 Implantáty | 31 |
| 3.2 Adsorpce bílkovin..... | 33 |
| 3.3 Aktivace destiček..... | 35 |
| 3.4 Souvislost aktivace destiček s imunitními mechanismy..... | 40 |
| 3.5 Metody pro studium krevních destiček..... | 42 |
| 3.5.1 Počítání trombocytů..... | 42 |
| 3.5.2 Funkční testy..... | 43 |
| 3.6 Protideštičková léčba | 46 |
| 4 Příklady studií destiček s implantáty | 48 |
| 4.1 Stent | 48 |
| 4.2 Náhrada srdeční chlopně..... | 51 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 4.3 Osseointegrované implantáty..... | 53 |
| ZÁVĚR | 55 |
| POUŽITÁ LITERATURA | 56 |

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Struktura trombocytu | 15 |
| Obrázek 2: Tvorba trombocytů..... | 17 |
| Obrázek 3: Model produkce krevních destiček | 18 |
| Obrázek 4: Povrchy vzorků v jednotlivých třídách trombogenity..... | 33 |
| Obrázek 5: Cytoskeletální uspořádání aktivované krevní destičky | 37 |
| Obrázek 6: Změny v cytoskeletální organizaci aktivované destičky během rozpínání | 37 |
| Obrázek 7: Souhrn změn cytoskeletu při aktivaci krevních destiček.. | 39 |
| Obrázek 8: Typické schéma přípravy vzorku pro analýzu destiček průtokovou cytometrií plné krve | 45 |
| Obrázek 9: Funkční model a proces přípravy povlaku „one-products-multi“ | 49 |
| Obrázek 10: Povlaky (rhCol III/PDA-PEI) _n (n = 0,5, 1, 2 a 4) zlepšují krevní kompatibilitu..... | 50 |
| Obrázek 11: Snímky skenovacího elektronového mikroskopu skla, PyC, skla s hrubým povlakem a skla s hierarchickým povlakem. | 52 |
| | |
| Tabulka 1: Nejdůležitější látky uvolňované trombocyty | 23 |
| Tabulka 2: Chemokiny a jejich receptory | 25 |
| Tabulka 3: Vybrané chemokiny CC spolu s jejich imunologickou rolí v organismu..... | 26 |
| Tabulka 4: Vybrané chemokiny CXC spolu s jejich imunologickou rolí v organismu..... | 28 |
| Tabulka 5: TLR a jejich reakce při aktivaci krevních destiček. | 41 |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| ADP | Adenosindifosfát |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| BMHV | Mechanické srdeční chlopně |
| BMM | biomimetický vícevrstvý materiál (biomimetic, multilayered materiál) |
| BMS | Holé kovové stenty |
| CCL2 | Chemokin s motivem C-C 2 |
| CCR2 | C-C chemokinový receptor typu 2 |
| CXCL8 | Chemokin s motivem C-X-C 8 |
| CXCR3 | C-X-C chemokinový receptor typu 3 |
| DARC | Duffyho antigen/chemokinový receptor |
| DES | Lékové stenty |
| DMS | Ohraničující membránový systém |
| FXII | Faktor XII |
| FXIIa | Aktivovaná forma faktoru XII |
| GP | Glykoproteinů |
| HMGB1 | protein „High Mobility Group Box 1“ |
| HPLC | Vysokorychlostní kapalinová chromatografie |
| ISR | Vnitrostentová restenóza |
| NET | Neutrofilní extracelulární pasti |
| PCL | Polykaprolakton |
| PCU | Polykarbonátový uretan |
| PDGF | Destičkový růstový faktor |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |

| | |
|-----------|--|
| PET | Polyethyltereftalát |
| PMP | Polymethylmethakrylát |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| rhCol III | Rekombinantního humanizovaného kolagenu typu III |
| TLR | Toll-like receptor |
| TSP1 | Trombospondin 1 |
| TXA2 | Tromboxan A2 |
| VEGF | Vaskulární endoteliální růstový faktor |
| vWF | Von Willebrandův faktor |

ÚVOD

Implantace umělých materiálů je běžným lékařským postupem v moderní medicíně. Tyto materiály slouží k nahrazení, opravě nebo vylepšení funkce orgánu nebo tkáně. Tyto implantáty mohou být vyrobeny z různých materiálů, jako je kov, plast, sklo nebo biologicky kompatibilní materiály. Přestože tyto materiály přinášejí mnoho výhod, jejich interakce s biologickým prostředím může zároveň stát za řadou komplikací. Mezi ně patří mimo jiné aktivace trombocytů, a nežádoucím následkům jako je tvorba trombu a spuštění reakce imunitního systému.

Trombocyty, známé také jako krevní destičky, jsou klíčovou složkou hemostatického systému a zastávají zásadní úlohu při zajištění hemostázy a tkáňového hojení. Jejich aktivace je regulována složitým souborem signálních drah a interakcí s okolními buňkami a molekulami. Mezi tyto signální molekuly patří chemokiny, které představují důležitý prostředek komunikace mezi krevními destičkami a okolními tkáněmi. Po implantaci umělého materiálu se trombocyty aktivují a adherují k povrchu materiálu. To může vést k tvorbě trombů, krevních sraženin, které mohou blokovat cévy a vést k závažným komplikacím, jako je trombóza, infarkt nebo mozková mrtvice. Aktivace trombocytů je komplexní proces, který je ovlivněn řadou faktorů. Mezi ně patří také vlastnosti materiálu, jako jeho povrchová topografie a hydrofilita, a dále biochemické faktory krve, jako je fibrinogen, von Willebrandův faktor a trombin.

Cílem této práce je shrnutí aktuálního porozumění této problematice. Toto shrnutí je klíčové nejenom pro zlepšení úspěšnosti implantací a minimalizaci komplikací spojených s jejich použitím, ale také poskytuje důležité poznatky pro další vývoj a optimalizaci umělých materiálů v oblasti biomedicíny a chirurgie.

1 KREVNÍ DESTIČKY

Primární funkcí krevních destiček je aktivní účast v procesu hemostáze, který vzniká v reakci na poškození cév s cílem zastavit krvácení a minimalizovat ztrátu krve. Při poškození trombocyty rychle reagují a přilnou k místu poranění, uvolní obsah intracelulárních granul a navzájem interagují s jinými aktivovanými destičkami k vytvoření destičkového shluku (Thomas, 2019). Dále kromě hemostázy a trombózy se u trombocytů zkoumá jejich role i z hlediska dalších procesů, které probíhají v těle, jako jsou záněť, ateroskleróza, antimikrobiální obrana a nádorový růst (Gremmel et al., 2016).

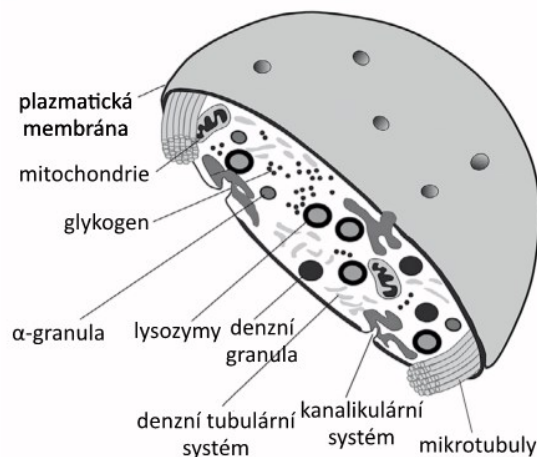
1.1 Morfologie

Krevní destičky neboli trombocyty řadíme mezi krevní elementy krve. Jsou to nejmenší bezjaderné buněčné fragmenty o průměr 2-5 μm . Fyziologický počet trombocytů je 150 až 300×10^9 v 1 litru krve. Nadměrné zvýšení počtu krevních destiček nad hodnotu fyziologickou se označuje jako trombocytóza a naopak pokles se nazývá trombocytopenie. Počet krevních destiček je regulován trombopoetinem, který je tvořen v ledvinách a játrech (Chottová Dvořáková et al., 2023).

V periferní krvi jsou dvě třetiny krevních destiček z jejich celkového počtu, ve slezině je zbývající třetina. Tato zadržovaná třetina slouží jako tzv. zásobní pool organismu, který je v rovnováze s kolujícím počtem trombocytů v krvi. Slezina v případě potřeby snadno uvolní rezervní množství do periferní krve například působením adrenalinu. V periferní krvi jsou heterogenně přítomny krevní destičky různého stáří, velikosti, tvaru a struktury. Trombocyty mladšího věku jsou větší, mají kvalitnější funkce, mají hustší cytoplazmu s více granuly. Starší trombocyty jsou pravým opakem. Další rozdíl (mezi mladým a starším trombocytom) je v počtu vazebných míst, mladé krevní destičky jich mají více. Trombocyty mají na svém povrchu různé skupiny receptorů, které mají za úkol zachycovat signál z vnějšího prostředí, ale také slouží k navázání některých aktivačních a stimulačních látek. Trombocyty přežívají v periferní krvi zpravidla 9-12 dní. Kratší doba přežití v periferní krvi může směřovat k trombocytopenii, pokud nejsou dostatečně nahrazovány novotvorbou. Staré a poškozené krevní destičky jsou odstraňovány monocyto-makrofágovým systémem, a to ve slezině, játrech a kostní dřeni (Pulcer et al., 2022).

Buněčná membrána krevních destiček se skládá z lipidové dvojvrstvy, v níž jsou zabudovány proteiny. Nejvíce zastoupených lipidů jsou fosfolipidy. Rozložení fosfolipidů v membráně je asymetrické (Thomas, 2019). Vnější vrstva obsahuje převážně neutrální

fosfolipidy, zatímco ve vnitřní vrstvě jsou nejvíce zastoupeny negativně nabitě fosfolipidy jako je fosfatidylinositol a fosfatidylserin, které při klidovém režimu nepřijdou do styku s krví. Membránové proteiny se skládají převážně z glykoproteinů (GP), které pronikají celou tloušťkou membrány (Chottová Dvořáková et al., 2023). Rozložení lipidů je udržováno ATP-dependentní flipázou. Díky uspořádání fosfolipidů, povrch klidové krevní destičky nepodporuje koagulaci, dokud nenastane její aktivace (Thomas, 2019). Buněčná membrána trombocytu je zvrásněná a vytváří četné invaginace, které se nazývají otevřený kanalikulární systém (Obr. 1). Tento systém významně zvětšuje povrch buněčné membrány. Větší povrch znamená, že na něm může být umístěno více receptorů. Tyto receptory slouží k navázání plazmatických koagulačních faktorů a vápníku, což je důležité pro spuštění hemostázy (Chottová Dvořáková et al., 2023) a více popsány jsou v následující podkapitole.



Obrázek 1: Struktura trombocytu (Chottová Dvořáková et al., 2023)

1.2 Funkce

Funkce trombocytů v těle zahrnuje několik klíčových aspektů, které se především týkají zastavení krvácení (primární i sekundární hemostáza) a obnovy vnitřního povrchu cévní stěny při poranění či důsledku poškození aterosklerotického procesu. Kromě toho mají schopnost fagocytózy a transportu různých látek (Chottová Dvořáková et al., 2023).

Primární funkcí krevních destiček je vytváření destičkové zátky, ta se tvoří během 2 - 4 minut (Křížková, 2021). Tento proces je spuštěn, když se trombocyty dostanou do kontaktu s poškozenou stěnou cévy nebo s cizím povrchem (Chottová Dvořáková et al., 2023). Po poškození stěny cévy dochází k aktivaci trombocytů, která je zprostředkována jejich interakcí se subendoteliálními strukturami. Aktivace trombocytů je spojena s produkcí

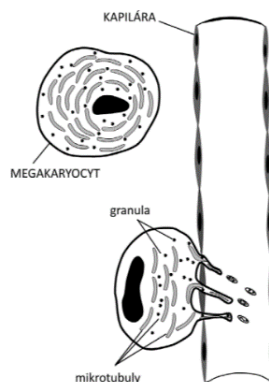
cyklického adenosinmonofosfátu a cyklického guanosinmonofosfátu, což způsobí změny v trombocytech a přesunu intracelulárního Ca^{2+} . Tyto změny jsou klíčové pro následující fáze vytváření krevní sraženiny, jako jsou adheze, změny tvaru destiček, sekrece, agregace a retrakce (Dulíček, 2022).

V první fázi, zvané adheze, dochází k hromadění trombocytů na místě poškozené endoteliální výstelky ihned po poranění cévy. Trombocyty se přichytávají k subendoteliálním strukturám, rychlá adheze je zprostředkována přítomností GPIa na povrchu trombocytů. Pro pokračování tohoto procesu je nezbytná přítomnost dalšího glykoproteinového receptoru GPIb-IX-V a von Willebrandova faktoru (vWF) (Dulíček, 2022). Pevné spojení mezi destičkou a kolagenovými vlákny je díky interakci mezi imobilizovaným VWF a GPIb-IX-V. Toto umožňuje vázání kolagenu na nízkoafinitní GPVI (Gremmel et al., 2016). Když krevní destičky přijdou do kontaktu s kolagenem, který se nachází na poškozené cévní stěně, začnou se morfologicky měnit. Jejich původní plochý tvar se změní na kulatý. Kromě toho začnou vytvářet výběžky membrány, které se nazývají pseudopodie. Tyto pseudopodie umožňují trombocytům se přichytit k poškozenému místu cévní stěny a rozprostřít se po ní, dále dochází k úpravám povrchových vlastností membrány destiček a k uvolňování důležitých faktorů. Ve fázi sekrece dochází k uvolňování obsahu α granul, které obsahují vWf, trombospondin, destičkový růstový faktor (PDGF), faktor V, β -tromboglobulin a další faktory. Při silnějším stimulu dochází k uvolňování obsahu δ granul, které obsahují adenosindifosfát (ADP), adenosintrifosfát (ATP), serotonin a Ca^{2+} . Dalším stadiem je agregace, v tomto stadiu se trombocyty, které se již přichytily k poškozené cévní stěně, shlukují s dalšími trombocyty, které proudí v krvi. Hlavními faktory, které indukují agregaci trombocytů, jsou ADP a tromboxan A₂ (TXA₂) a dále se podílí trombin, který se tvoří v malém množství na povrchu trombocytů. Agregace trombocytů vyžaduje přítomnost dvou glykoproteinových receptorů (GPIIb a GPIIIa) v membráně destiček, Ca^{2+} a fibrinogenu (Dulíček, 2022). Aktivovaný α IIB β 3 (GPIIb-IIIa) umožňuje destičkám mezibuněčné interakce a tvorbu destičkových agregátů tím, že se vážou na divalentní fibrinogen (Gremmel et al., 2016). Prostacyklin PGI₂ zabraňuje tvorbě krevní sraženiny mimo místo poranění. Adheze a agregace krevních destiček vedou k vytvoření tzv. primární hemostatické zátky. Retrakce, neboli smrštění už vytvořené krevní sraženiny, představuje závěrečný krok v primární hemostáze. Retrakce je funkcí destiček, která umožňuje jejich pseudopodiím přilnout k fibrinovým vláknům (Dulíček, 2022). Fibrinová vlákna, která podporují tvorbu zátky, vznikají z bílkoviny krevní plazmy známé jako fibrinogen (Křížková, 2021).

Jednotlivé fáze koagulační kaskády probíhají na povrchových fosfolipidech u aktivního trombocytu. Během tohoto procesu krevní destičky také uvolňují různé bioaktivní látky, včetně růstových hormonů (např. PDGF), které hrají klíčovou roli v procesu hojení. Na reakci se dále podílí serotonin, tromboplastin, protrombin, trombin, fibrinogen a fibrin. Po vzniku destičkové zátky dochází k dokončení procesu koagulace, který představuje poslední fázi hemostázy a následně dochází k vytvoření krevní sraženiny (Křížková, 2021).

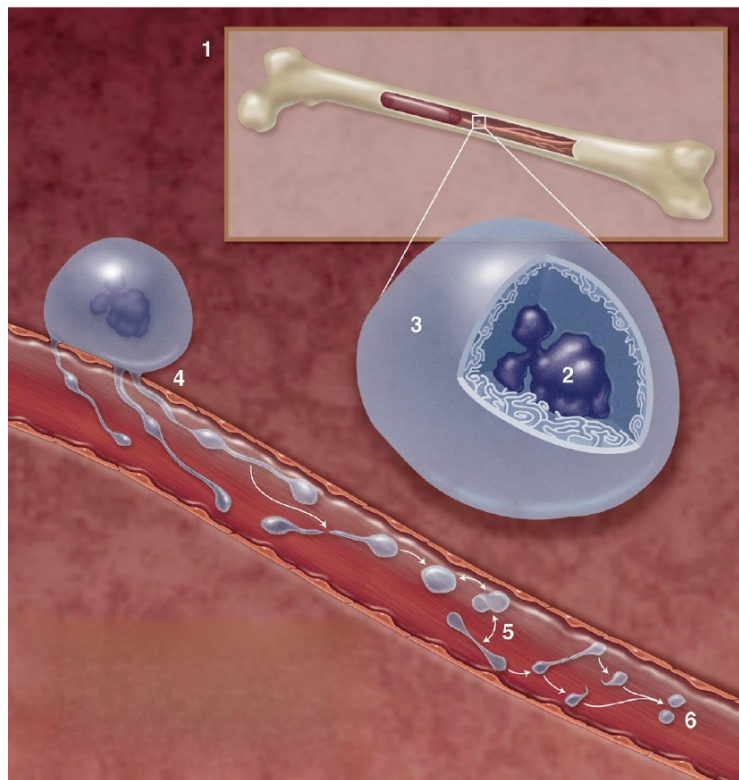
1.3 Tvorba

Proces vytváření krevních destiček je známý jako trombopoéza a probíhá v kostní dřeni. Zde se trombocyty tvoří z prekurzorových buněk, konkrétně z megakaryocytů, kteří představují pouze malý zlomek celkové buněčné populace kostní dřeni. Megakaryocyty se vyvíjejí z pluripotentní kmenové buňky se schopností diferenciací v řadu myeloidní a lymfoidní. Megakaryocyty pocházejí z myeloidní řady. Během svého zrání se značně zvětšují, což je výsledkem speciálního druhu buněčného dělení zvaného endomitóza. Během tohoto procesu dochází k dělení jádra, ale nedochází ke zaškrcení cytoplazmy, a nevznikají dvě samostatné buňky, což způsobuje, že jádro megakaryocytů je lobulizované (velké kulaté). Plazmatická membrána megakaryocytů vytváří tzv. ohraničující membránový systém (DMS) skrze invaginaci. K tvorbě DMS přispívají také aktin a mikrotubuly, která se později stanou součástí cytoskeletu nově vzniklých destiček. Přesná role DMS není zcela jasná, ale pravděpodobně slouží jako zdroj membrány pro výběžky cytoplazmy aktivovaných megakaryocytů. Tyto výběžky zasahují přímo do dutiny krevních vlásečnic, kde se oddělují a tvoří samotné krevní destičky (Obr.2). Z jednoho megakaryocytu může vzniknout až několik tisíc destiček. Mladé destičky obvykle obsahují zbytky RNA, tyto trombocyty se nazývají retikulotrombocyty (Chottová Dvořáková et al., 2023).



Obrázek 2: Tvorba trombocytů (Chottová Dvořáková et al., 2023)

Při studiu krevních destiček byly navrženy různé modely jejich produkce, mezi které patří pučení trombocytu, cytoplazmatická fragmentace prostřednictvím IMS a tvorba protrombocytů (Obr. 3). Schéma na obrázku č. 3 znázorňuje přeměnu, krevní kmenové buňky v kostní dřeni v přítomnosti trombopoetinu na megakaryocyty. Megakaryocyty procházejí procesem zvaným endomitóza, při kterém se jejich jádra replikují bez dělení buňky. V důsledku toho se obsah DNA v jejich jádrech může pohybovat od až po 128n. Během procesu zrání megakaryocytů se vytvoří v cytoplasmě složitá, vlnitá membrána (invaginovaná membrána). Tato membrána je spojená s vnitřní plazmatickou membránou a slouží jako zásobárna pro tvorbu protrombocytů. Ve vaskulárním prostředí se megakaryocyty vyvíjejí a uvolňují protrombocytů do krevního oběhu. Celý megakaryocyt se přitom přeměňuje na pre/protrombocytů a jeho jádro je postupně vypouštěno a fagocytováno. Po vstupu do krevního oběhu se protrombocytů rozpadají na pretrombocytů. Při štěpení protrombocytů ve tvaru činky vzniknou dvě krevní destičky (Machlus et al., 2019).



Obrázek 3: Model produkce krevních destiček (1) vývoj megakaryocytů v kostní dřeni, 2) Endomitóza za vzniku polyploidního jádra, 3) Cytoplazmatické zrání, 4) Formování a uvolnění protrombocytů, 5) přeměna protrombocytů na pretrombocytů, 6) uvolňování trombocytů). Upraveno podle (Machlus et al., 2019).

1.4 Povrchové receptory

Na povrchu krevních destiček se nachází mnoho různých glykoproteinů s funkcí receptorů. Mezi nejdůležitější z nich patří glykoproteinové komplexy GPIb-IX-V, GPVI a integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Tyto glykoproteiny hrají klíčovou roli při adhezi, aktivaci a agregaci destiček (Gremmel, 2016).

Glykoproteinový komplex Ib-IX-V je jedním z nejhojnějších receptorových komplexů na povrchu krevních destiček (Klaeske et al., 2023). GPIb-IX-V komplex se skládá ze 4 podjednotek: GPIb α , GPIb β , GPV a GPIX (Gremmel et al., 2016). Hlavní podjednotkou je GPIb α , která obsahuje vazebné místo pro vWF (Klaeske et al., 2023). GPIb-IX-V umožňuje krevním destičkám v krevním řečišti připoutat se k subendoteliální matrix prostřednictvím interakce s vWF na místech poranění cévní stěny. Ten pak spustí sekreci autokrinních/parakrinních mediátorů, jako je ADP a TXA₂. Poškozený endotel aktivuje destičky prostřednictvím komplexu GPVI a integrinu $\alpha\text{II}\beta\text{1}$, což způsobuje jejich hromadění. Nakonec aktivace GP IIb-IIIa vede hemostatické zátky (Enomoto et al., 2023). GPIb-IX-V také vyvolává prokoagulační aktivitu na aktivovaných krevních destičkách poskytnutím míst pro vázání α trombinu, faktoru XI a vysokomolekulárního kininogenu (Gremmel et al., 2016).

Trombospondin (TSP1) působí jako další ligand pro GPIb-IX-V (Gremmel et al., 2016). Zejména molekula Trombospondin 1 se váže na receptor GPIb α na povrchu krevních destiček (Li, 2019). TSP1 dokáže podporovat adhezi destiček i v případě, že není přítomen von Willebrandův faktor (Gremmel et al., 2016). Vědci zkoumali, zda TSP1 přímo interaguje s GPIb α , ale zatím nenašli dostatek důkazů. Zdá se, že TSP1 spíše ovlivňuje tvorbu trombů z destiček nepřímým způsobem, a to za přítomnosti vWF. Pravděpodobně TSP1 brání štěpení VWF enzymem ADAMTS13, což stabilizuje trombus a zabraňuje jeho rozpadu (Li, 2019).

Integrin $\alpha\text{M}\beta\text{2}$, také zvaný jako Mac-1, slouží jako protireceptor pro GPIb-IX-V, umožňující připojení destiček k leukocytům (Gremmel et al., 2016). Tato interakce umožňuje adhezi a migraci leukocytů na místech, kde došlo k usazeninám krevních destiček a poškození cév. Specifické zbytky v oblasti integrační domény $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ jsou důležité pro jeho vazbu na vazebnou doménu pro ligand GPIb α . Bylo zjištěno, že lektinová doména $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ rozpoznává zbytky β -N-acetylglukosaminu na GPIb α na krevních destičkách za chladu (Li, 2019).

Krevní destičky vytvářejí pevné spojení s kolagenovými vlákny díky interakci mezi imobilizovaným VWF a GPIb-IX-V. Toto umožňuje vázání kolagenu na nízkoafinitní GPVI, spouštějící intracelulární signály, které aktivují integriny, jako jsou $\alpha\text{II}\beta\text{1}$ a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, spolu s dalším shlukováním GPVI. Tímto mechanismem dochází k posílení aktivace GPVI, což

následně podporuje stabilní přichycení krevních destiček prostřednictvím vazby $\alpha\text{IIb}\beta\text{1}$ a $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na kolagen a VWF. GPVI je důležitý receptor na krevních destičkách, který hraje roli v hemostáze a dalších procesech zprostředkovaných destičkami. GPVI existuje v monomerní a dimerní formě. Monomerní forma je přítomna zejména na neaktivovaných krevních destičkách a má nízkou afinitu ke kolagenu. Dimerní forma má vyšší afinitu ke kolagenu a je zodpovědná za aktivaci krevních destiček (Gremmel et al., 2016). Může také vázat další látky, ale účel některých z nich zůstává nejasný (např. fibrin, fibrinogen, lamininy, histon) (Koo et al., 2022). Receptor GPVI spolupracuje s proteiny $\text{FcR}\gamma$ pro aktivaci signální dráhy. $\text{FcR}\gamma$ jsou důležité pro signalizaci i umístění GPVI na povrchu destiček. Shlukování GPVI v membráně aktivuje enzymy Lyn, Fyn a Src, které fosforylují ITAM motivy. To umožňuje vazbu a aktivaci proteinu Syk, čímž se spustí kaskáda dalších reakcí. Klíčovým výsledkem je aktivace enzymu fosfolipázy $\text{C}\ \gamma\text{2}$ ($\text{PLC}\gamma\text{2}$) a následné zvýšení hladiny vápníku v buňce (Haining et al., 2019). Přestože je role GPVI v aktivaci trombocytů jasná, jeho deficit u lidí a myší nemá zásadní vliv na hemostázu. GPVI hraje klíčovou roli v prevenci krevních sraženin v tepnách (arteriální trombóza) a probíhají výzkumy, zda by se zablokování vazby GPVI na kolagen dalo využít jako lék na tento typ trombózy. Navíc je GPVI klíčovým faktorem při udržování cévní integrity během zánětu a může hrát další roli při žilní trombóze (Koo et al., 2022). Bez řetězce $\text{FcR}\ \gamma$ se GPVI nedostane na povrch krevních destiček a aktivace destiček způsobená kolagenem není spuštěna (Gremmel et al., 2016). Po navázání ligandu na GPVI je zahájen přenos signálu prostřednictvím fosforylace imunoreceptorů s aktivací tyrozinu (ITAMs) ve dvojici řetězců γ receptoru Fc ($\text{FcR}\ \gamma$ -řetězec), který je trvale spojen s GPVI (Koo et al., 2022). Po aktivaci kolagenem nebo jinými agonisty je GPVI rychle odstraněn z povrchu krevní destičky, pravděpodobně jako ochranný mechanismus před nadměrnou aktivací megakaryocytů a krevních destiček vyvolanou kolagenem v kostní dřeni a po drobných poškozeních cévního systému (Gremmel et al., 2016).

Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (také známý jako GPIIb-IIIa a CD41/61) je exprimovaný na povrchu destiček. Tento receptor patří do rodiny adhezních receptorů (Bledzka et al., 2019). Nachází se na povrchu krevních destiček, megakaryocytů, žírných buněk, bazofilních buněk a některých nádorových buněk (Gremmel et al., 2016). Na povrchu destiček představuje integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ hlavní plazmatický membránový protein. Tvoří zhruba 3 % z celkového množství proteinu v destičce a zhruba 17% hmotnosti proteinu v membráně destičky. Každá destička obsahuje mezi 80 000 až 100 000 kopií tohoto integrinu (Bledzka et al., 2019). $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ je heterodimer složený ze dvou podjednotek, αIIb a β3 , které jsou syntetizovány jako jednoduché glykosylované

proteiny (Gremmel et al., 2016). Stěžejní funkcí integrinu $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ je jeho schopnost aktivovat se, což znamená přechod z nízkoafinního klidového stavu do vysokoafinního aktivního stavu, ve kterém může vázat své extracelulární ligandy (Bledzka et al., 2019). Aktivace destiček vyvolaná agonisty spouští vnitrobuněčné signální události, které se sbíhají na cytoplazmatických koncích $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ a následně se přenášejí přes membránu destiček pomocí transmembránové signalizace inside-out. Toto nakonec vede k transformaci vnější části $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, čímž se vytvoří vysokoafinní receptor pro fibrinogen a VWF. Aktivovaný $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ umožňuje interakce mezi destičkami a tvorbu destičkových agregátů prostřednictvím vazby divalentního fibrinogenu nebo multivalentního VWF. Kromě toho může aktivovaný $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ vázat další sérové proteiny, jako je vitronektin, fibronektin a trombospondin-1. Tyto proteiny pomáhají destičkám se navázat k subendoteliálním strukturám a regulovat jejich agregaci (Gremmel et al., 2016).

1.5 Vnitřní struktura

Trombocyty obsahují mitochondrie, denzní tubulární systém, granula, glykogen, kanalikulární systém a cytoskelet (Obr. 1, kapitola 1.1). Cytoskelet trombocytů, skládající se z mikrotubulů a mikrofilament, plní roli v udržování klidového tvaru těchto buněk. Současně se aktivně zapojuje do procesů aktivace destiček (Chottová Dvořáková, 2023).

V trombocytu se nachází tři typy granul: α granula, denzní granula a lysozomy (Chottová Dvořáková et al., 2023). Z nich jsou α granula nejvýznamnější a nejpočetnější. Jsou kulaté až oválné, s průměrem 200–500 nm, a v každé destičce jich najdeme 40 až 80 (Thomas, 2019). α granula obsahují proteiny, specifické pro destičky, proteiny shodné s plazmatickými proteiny a mitogenní proteiny (Chottová Dvořáková et al., 2023). Tyto proteiny mají různé a proměnlivé funkce, které jsou uvolňovány z destiček po aktivaci (Thomas, 2019). Megakaryocyty produkují specifické destičkové proteiny a zahrnují destičkový faktor 4 a tromboglobulin. V α granulích se nachází i další proteiny, které se běžně vyskytují v plazmě, včetně fibrinogenu, faktoru V, inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1), plazminogenu a vWF. Předpokládá se, že megakaryocyty anebo destičky tyto proteiny aktivně absorbují a ukládají v granulích. Nejdůležitějším mitogenním faktorem v α granulích je destičkový růstový faktor (Chottová Dvořáková, 2023).

Denzní granula, nazývané také δ granule, jsou menší a méně časně než α granule. Obvykle se v jedné destičce nachází 3–8 denzních granulí o velikosti kolem 150 nm (Thomas, 2019). V denzních granulech se nachází především serotonin, dvojmocný kationty

(Ca²⁺, Mg²⁺) a nukleotidy (ATP, ADP), tzn. látky nezbytné pro aktivaci destiček, a důležité pro vazokonstrikci (Chottová Dvořáková et al., 2023). Absence δ granulí může vést k řadě onemocnění, například Hermansky-Pudlakův syndrom nebo Chediak-Higashiho syndrom (Thomas, 2019).

Lysozomy a peroxizomy se v krevních destičkách nacházejí v relativně malých množstvích (Chottová Dvořáková et al., 2023). Kulaté lysozomy mají průměr kolem 200-250 nm, jedna krevní destička obsahuje až 3 lysozomy, které obsahují řadu degradačních enzymů. Přesná funkce této organely není plně objasněna, předpokládá se, že jejich funkce spočívá v degradaci cytosolických proteinů. Lysozomy během aktivace krevní destičky mohou uvolnit svůj obsah, který může napomoci k degradaci proteinů a extracelulárních faktorů, ty jsou potřebné pro správnou funkci hemostázy (Thomas, 2019). Lysozomy obsahují řadu enzymů, katepsin D a E, lysozomální membránový protein (LAMP)-2 (Gremmel et al., 2016). Lysozomy mají schopnost uvolnit svůj obsah tehdy, když se destička naváže k subendotelové hmotě, proto se lysozomy označují jako třetí typ granul (Chottová Dvořáková et al., 2023).

Další známé látky uvolňované krevními destičky jsou uvedené v Tab. 1

Tabulka 1: Nejdůležitější látky uvolňované trombocyty. Převzato a upraveno z (Chottová Dvořáková et al., 2023)

| Látka | Lokalizace | Funkce |
|--|------------------|--|
| destičkový růstový faktor (PDGF) | α granula | růstový faktor (angiogeneze) |
| destičkový faktor 4 | α granula | antagonista heparinu |
| von Willebrandův faktor (vWF) | α granula | protrombotický faktor |
| fibrinogen | α granula | koagulační faktor |
| inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (PAI-1) | α granula | inhibice fibrinolýzy |
| Serotonin | denzní granula | vazokonstrikce |
| Nukleotidy (ADP, ATP) | denzní granula | podporuje agregaci trombocytu |
| tromboxan A2 | Cytoplazma | vazokonstrikce |
| destičkový faktor 3 | buněčná membrána | destičkové fosfolipidy-aktivace některých srážecích faktorů |

2 CHEMOKINY DESTIČEK

V následujícím textu jsou popsány důležité chemokiny pro aktivitu destiček. Jak se ukazuje, chemokiny jsou produkovány destičkami anebo se vážou na receptory destiček. V důsledku obou efektů mají destičky mnohem větší roli v imunitních mechanismech, například i u transplantací (Şentürk, 2023).

Chemokiny tvoří rozsáhlou skupinu cytokinů, v lidském těle je známo přes 50 chemokinů, přičemž jejich počet stále roste. Chemokiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností, které patří do rodiny cytokinů s chemotaktickými vlastnostmi (Cisoň-Jurek et al., 2019). Chemokiny snadno pronikají parenchymem a zprostředkovávají regulaci přísunu zánětlivých buněk do oblasti poškozené tkáně a imunitní odpovědi na základě koncentračního gradientu (Stříž et al., 2015). Chemokiny mají klíčovou úlohu v mnoha biologických procesech, včetně vývoje, imunity, zánětu a hojení tkání, a zároveň hrají důležitou roli v aktivaci imunitních buněk (Cisoň-Jurek et al., 2019). Kromě toho zajišťují také regulaci homeostatického přísunu buněk za fyziologických podmínek a ovlivňují migraci buněk během reparačních procesů (Stříž et al., 2015).

Chemokiny se skládají z 70 až 130 aminokyselin a mají podobnou strukturu jako růstové faktory. Většina chemokinů obsahuje čtyři cysteinové zbytky, které vytvářejí disulfidové můstky a ovlivňují jejich trojrozměrnou strukturu. Počet cysteinových zbytků a jejich vzájemná poloha se staly klíčovými prvky při klasifikaci chemokinů. Tyto látky byly rozděleny do čtyř skupin (CXC, CC, CX3X a XC) podle své struktury, označované zkratkami, kde C značí cystein a X představuje libovolné aminokyselinové zbytky (Cisoň-Jurek et al., 2019). Tyto skupiny se odlišují na základě umístění cysteinů na N-terminálním konci (Stříž et al., 2015). V CC skupině jsou cysteiny umístěny těsně vedle sebe, v CXC skupině jsou odděleny libovolnou aminokyselinou (Legler et al., 2016). V roce 2000 byla zavedena systematická nomenklatura, která zahrnuje označení podčeledi, následované písmenem L (označující "ligand") a číslo podle toho, kdy byl gen poprvé izolován (Hughes et al., 2018). Interakce mezi chemokiny a jejich receptory je výrazně charakteristická tím, že jeden chemokin obvykle může interagovat s několika receptory (Tab. 2). Tyto receptory jsou často přítomny na různých skupinách buněk. Tato rozmanitost umožňuje efektivní regulaci přílivu buněk na místo poškození, přičemž případné nedostatky v produkci jednoho chemokinu mohou být vyváženy nadměrnou produkcí jiného (Stříž et al., 2015).

Tabulka 2: Chemokiny a jejich receptory. Upraveno podle: (Stříž et al., 2015)

| CCL CHEMOKINY | | | |
|---------------|----------------|----------------|--|
| Označení | Původní název | Chromozom | Receptor |
| CCL2 | MCP-1 | 17q11.2- q21.1 | CCR2, CCR3, DARC (Duffyho antigen/chemokinový receptor), CCBP2 |
| CCL3 | MIP- α | 17q12 | CCR1, CCR5, CCBP2 |
| CCL5 | RANTES | 17q11.2- q12 | CCR1, CCR3, CCR5, DARC, CCBP2, CCRL2 |
| CCL7 | MCP-3 | 17q11.2- q12 | CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, DARC, CCBP2 |
| CCL17 | TARC | 16q13 | CCR4, DARC, CCBP2 |
| CXC CHEMOKINY | | | |
| CXCL1 | GRO- α | 4q13.3 | CXCR2, DARC |
| CXCL4 | PF4 | 4q13.3 | CXCR3 |
| CXCL5 | ENA-78 | 4q13.3 | CXCR2, DARC |
| CXCL7 | NAP-2 | 4q13.3 | CXCR2, DARC |
| CXCL8 | IL-8 | 4q13.3 | CXCR1, CXR2, DARC |
| CXCL12 | SDF-1 α | 10q11.1 | CXCR4, CXCR7 |

2.1 CC chemokiny

Největší skupinou chemokinů jsou chemokiny skupiny CC. Rodinu chemokinů CC tvoří 28 členů, kteří mají různorodé působení (Cisoň-Jurek et al., 2019). CC chemokiny mohou být produkovány konstitutivně nebo indukčně. Konstitutivní produkce je charakteristická pro ty chemokiny z CC skupiny, které se podílejí na regulaci přirozené obměny buněk. Indukovatelně produkované chemokiny jsou ty, které přitahují leukocyty do postižených oblastí (Stříž et al., 2015). Imunologická role jednotlivých CC chemokinů je popsána v Tab. 3 (Cisoň-Jurek et al., 2019).

Tabulka 3: Vybrané chemokiny CC spolu s jejich imunologickou rolí v organismu. Upraveno podle: (Cisoň-Jurek et al., 2019).

| Chemokiny | Role |
|-----------|---|
| CCL2 | Vyказuje chemotaktickou aktivitu pro monocyty a bazofily; účastní se v patogenezi onemocnění (revmatoidní artritida, psoriatická artritida, ateroskleróza, roztroušená skleróza, odmítání transplantátu, alergická onemocnění a astma), |
| CCL3 | Diferenciace buněk CD4+, interakce s CCL4; podíl na patogenezi onemocnění: HIV-1, revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, odmítnutí transplantátu, alergická onemocnění, astma. |
| CCL5 | Působí chemotakticky na monocyty, pomocných T lymfocytů a eosinofilů; způsobuje uvolňování histaminu z bazofilů a aktivuje eozinofily; Bývá součástí patogeneze následujících onemocnění: alergie, AIDS2, revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, odmítnutí transplantátu a astma. |
| CCL7 | Má chemotaktickou aktivitu pro makrofágy během zánětlivého procesu, účastní se vzniku metastáz. |

2.1.1 CCL2

Chemokin skupiny CC 2 (CCL2), je známý také jako monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Stříž et al., 2015). CCL2 produkují různé buňky v těle – například makrofágy, endoteliální buňky a hladké svalové buňky (Liu et al., 2018).

Autoři Liu et al. (2018) zkoumali vliv CCL2 na fungování krevních destiček. Nejprve provedli studii agregace při různých koncentracích rekombinantního lidského CCL2 k charakterizaci rekombinantního lidského CCL2 s analýzou pomocí Western blotu a barvení Coomassie blue. Výsledky ukázaly, že při koncentraci CCL2 100 ng/ml došlo k významnému zvýšení agregace krevních destiček. CCL2 významně zvyšuje různé markery aktivace krevních destiček a sekreci granulí. CCL2 posílil expresi PAC-1 (marker rané aktivace) a CD62p (marker pozdní aktivace) na krevních destičkách, což indikuje zvýšenou aktivaci. CCL2 významně zvýšil uvolňování CD40L (z alfa granulí) a TXB2 (z denzních granulí). Pro lepší pochopení primárních účinků CCL2 na funkci krevních destiček při reakci na ADP nebo kolagen bylo zkoumáno, jak dochází k agregaci krevních destiček, aktivaci (PAC-1 a CD62p) a uvolňování

granulí (CD40L a TXB2) při kombinaci stimulace CCL2 a ADP/kolagenu. V porovnání s kontrolními skupinami stimulovanými pouze ADP nebo kolagenem došlo ve skupinách ADP + CCL2 a kolagen + CCL2 k významnému zvýšení agregace krevních destiček. Tyto výsledky naznačují, že CCL2 může mít vliv na zesílení agregaci, aktivaci a sekreci krevních destiček v odpovědi na stimulaci ADP nebo kolagenem (Liu et al., 2018).

2.1.2 CCL5

CCL5, známý jako Rantes, je látkou v těle s protizánětlivými vlastnostmi, které přitahují bílé krvinky na místa zánětu. Tento chemokin je chemotaktický pro T lymfocyty, eozinofily, NK buňky, bazofily, monocyty, mastocyty, a dendritické buňky. Hlavní producenti proteinu CCL5 jsou T-lymfocyty a monocyty. Vyskytuje se také v hojné míře v epiteliálních buňkách, pojivové tkáni (fibroblastech) a krevních destičkách (Takada et al., 2022).

Studie Takada et al. (2022) ukazuje, že chemokin CCL5 se váže na místo 1 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ a aktivuje $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ vázáním na místo 2, což je podobné chování jako u chemokinů CX3CL1 a CXCL12. Dále bylo prokázáno, že CCL5, CXCL12 a CX3CL1 se vážou na integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na povrchu trombocytů, čímž se stávají novými ligandy pro tento integrin. Aktivace integrinu $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ byla potlačena cyklickými peptidy vázanými na místo 2, což naznačuje nezbytnost vazby chemokinů na toto místo. Aktivace $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na povrchu buněk probíhá v nízkých koncentracích chemokinů a rychleji než u rozpustné formy. Výzkum naznačuje, že trombocytový integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ může být účinně aktivován chemokinovou signalizací nezávisle na klasických mechanismech směřujících dovnitř buňky. Vazba chemokinů na 2 místo integrinu $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ představuje potenciální terapeutický cíl pro léčbu trombózy (Takada et al., 2022).

Autoři Dickhout et al., (2021) ve studii ukázali, že endoteliální buňky aktivně a specificky vychytávají chemokiny CCL5 a CXCL4 prostřednictvím receptorům GPCR. Tento proces internalizace probíhá rychle a je závislý na teplotě a aktivaci G proteinu. Navzdory úloze receptoru CCR5 v signalizaci CCL5 se ukázalo, že jeho blokáda neovlivňuje vychytávání tohoto chemokinu, což naznačuje existenci dalších receptorů. Zvýšená intracelulární hladina vápníku a účinky enzymatického odstranění glykosaminoglykany (GAG) naznačují komplexní interakce s povrchovými strukturami buněk. Vnitrobuněčná akumulace CCL5 a CXCL4 naznačuje možné nové funkce těchto chemokinů. (Dickhout et al., 2021).

2.2 CXC chemokiny

CXC chemokiny lze rozdělit do dvou skupin podle přítomnosti tzv. motivu ELR, což je kombinace aminokyseliny glutamát-leucin-arginin. První skupinu tvoří chemokiny ELR-CXC,

kteře obsahují tento motiv, a druhou skupinu tvořící chemokiny bez ELR motivu (non-ELR). Tyto dvě skupiny se také odlišují ve funkcích, které plní (Stříž et al., 2015). Vybrané role chemokinů CXC jsou uvedeny v Tab. 4. Chemokiny patřící do skupiny ELR interagují s receptorem CXCR2 (méně často s receptorem CXCR1), zatímco ty patřící do podtypu non-ELR se vážou na ostatní receptory (viz Tab. 2, kapitola 2) (Cisoň-Jurek et al., 2019).

CXCL8 (IL-8) je chemokin obsahující motiv ELR, hraje klíčovou roli v zánětu a v regulaci přísunu neutrofilních leukocytů. Jeho receptory CXCR1 a CXCR2 představují terapeutické cíle pro léčbu chronických zánětlivých onemocnění. CXCL8 je indukován především antigeny bakteriálních stěn, prozánětlivými cytokiny (TNF α , IL-1 β , IL-17), a Th1 cytokin IFN γ . CXCL8 má proangiogenní aktivitu, která je částečně spojena s indukcí VEGF v endoteliálních buňkách prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru NF- κ B (Stříž et al., 2015).

Tabulka 4: Vybrané chemokiny CXC spolu s jejich imunologickou rolí v organismu. Upraveno podle: (Cisoň-Jurek et al., 2019).

| Chemokiny | Role |
|-----------|---|
| CXCL4 | Destičkový faktor 4 (PF4); vykazuje chemotaktickou aktivitu pro mnoho typů buněk, inhibitor hematopoézy, angiogeneze a funkce T-lymfocytů; uvolňovaný z alfa granul aktivovaných krevních destiček ve formě homotetrameru, který má vysokou afinitu k heparinu a podílí se na agregaci krevních destiček. |
| CXCL7 | Vykazuje chemotaktickou aktivitu pro neutrofilly; jedná se o bílkovinu uvolňovanou z krevních destiček po jejich aktivaci; stimuluje následující procesy: mitózu, syntézu extracelulární matrix, metabolismus glukózy a syntézu aktivátoru plazminogenu. Navazuje se na receptory CXCR2, ACKR1. |
| CXCL8 | Interleukin-8; vykazuje chemotaktickou aktivitu pro neutrofilly; silný promotor angiogeneze; účastní se patogeneze akutních bakteriálních infekcí; prozánětlivý mediátor v zánětu dásní; autokrinní růstový faktor buněčných linií u rakoviny tlustého střeva |

2.2.1 CXC chemokiny bez ELR motivu

CXCL4 a CXCL7 (NAP-2) patří mezi klíčové chemokiny produkované megakaryocyty a uvolňované z krevních destiček, které regulují migraci neutrofilů, jejich adhezi a průchod přes nestimulovaný endotel. CXCL4 má schopnost aktivovat i monocyty, tento chemokin se váže buď na CXCR3-B receptory nebo na proteoglykany, což spouští dvě odlišné signální dráhy. CXCL7 byl nalezen nejen v megakaryocytech, ale také v monocytárních buňkách kostní dřeně (Stříž et al., 2015).

2.2.2 CXCL4

Chemokin CXCL4, byl prvním objeveným členem skupiny chemokinů (Fox et al., 2018). Během agregace krevních destiček dochází k uvolnění CXCL4 z jejich alfa granul (Şentürk, 2023). Vyskytuje se hojně v aterosklerotických placích a jeho přítomnost zde je spojena s vážností tohoto onemocnění. řada důkazů naznačuje, že CXCL4 sehrává klíčovou roli v procesu aterogeneze (vzniku aterosklerózy). Po aktivaci destiček se CXCL4 uvolňuje v mikromolárních koncentracích a jeho ukládání na endotel zvyšuje tvorbu aterosklerotických lézí. Odstranění CXCL4 na stejném genetickém pozadí vede ke snížení velikosti aterosklerotických lézí. V odborné literatuře se diskutuje o tom, zda CXCL4 sám o sobě dokáže indukovat migraci monocytů, avšak bylo prokázáno, že vytváří funkční heterodimery s jinými chemokinovými látkami, jako je CCL5/ RANTES, které podporují zastavení monocytů na endotelu (Fox et al., 2018).

Nově se prokázalo, že PF4 komplex je antigenem při trombocytopenii vyvolané heparinem (HIT), což je autoimunitní reakce specifická pro podání antikoagulačního heparinu (Şentürk, 2023). Aktivace destiček přináší tvorbu malých a velkých trombů, což je hlavní nebezpečí spojené s HIT. Imunitní aktivace destiček při HIT je zprostředkována interakcí Fc části IgG s receptorem FcγRIIA na povrchu destiček, což vyvolává signální dráhu, která vede k sekreci granulí, uvolnění PF4 a tvorbě nových HIT imunokomplexů, čímž se vytváří začarovaný kruh. Aktivace krevních destiček je také doprovázena intenzivní tvorbou trombinu na negativně nabitých fosfolipidech, které jsou na vnější straně membrány, což představuje další zpětnovazebnou smyčku, která se sama aktivuje. Přímá aktivace destiček pomocí FcγRIIA v kombinaci s trombinovou dráhou vede k expresi P-selektinu a tvorbě prokoagulantních extracelulárních mikrovezikul. Jako součást mechanismu zpětné vazby při aktivaci destiček imunitními komplexy prochází receptor FcγRIIA štěpením a inaktivací závislou na kalpainu, aby se zabránilo nadměrné aktivaci destiček. Kalpain může také štěpit cytoskeletální proteiny a indukovat apoptózu destiček. To, společně se spotřebou destiček během mikrotrombózy,

naznačuje, že interakce FcγRIIA-HIT komplexu by mohla přispívat ke zvýšenému odstraňování destiček a zhoršovat trombocytopenii (Nevzorova et al., 2019).

3 INTERAKCE KREVNÍCH DESTIČEK S CIZÍMI MATERIÁLY

Hlavním problémem při vývoji implantátů, které přicházejí do přímého styku s krví, je nedostatečné pochopení mechanismů interakce mezi krví a materiálem. Krevní systém je vybaven citlivými obrannými mechanismy, které reagují na cizí materiály. Tyto reakce, nazývané hemostatické a zánětlivé kaskády, které rychle a často katastrofálně reagují na cizí materiály (Sotiri et al., 2019). Biomateriály používané pro výrobu zdravotnických pomůcek, aktivují krevní destičky v rozdílné míře, a může vést k tvorbě krevních sraženin na jejich povrchu. Aktivace krevních destiček může být způsobena několika faktory, mimo jiné: nadměrným smykovým napětím vznikajícím při průtoku krve; vlivem chemických látek, jako jsou endogenní toxiny nebo sloučeniny uvolňované z biomateriálů; elektrickým působením zeta potenciálu. Aktivované destičky následně spouští koagulační kaskádu vedoucí ke srážení krve a vzniku trombů na povrchu biomateriálu. Pro posouzení náchylnosti biomateriálů k tvorbě sraženin (trombogenicity) se měří procento aktivovaných krevních destiček (označených protilátkou anti-CD62p) pomocí průtokové cytometrie jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Při testování náchylnosti k tvorbě krevních sraženin z mechanických nebo chemických vlivů na krev se jako marker používá měření obsahu trombocytárních mikročastic (defragmentovaných membrán krevních destiček (Gawlikowski et al., 2022).

3.1 Implantáty

Implantáty, jako jsou umělé srdeční chlopně, stenty další moderní zdravotnické pomůcky sice pomáhají lidem s kardiovaskulárními problémy, ale zároveň mohou představovat riziko vzniku krevních sraženin. Proto je důležité vybírat pro jejich výrobu materiály s nízkou trombogenicitou, tedy nízkou náchylností k shlukování krevních destiček a tvorbě sraženin (Gawlikowski et al., 2022). Pro biomedicínské implantáty se nejčastěji využívají kovy, polymery, kompozity a keramika (Huang et al., 2024). Další co, zlepšuje nebo dokonce zachraňuje život pacienta je transplantace. Transplantace orgánů je revoluční léčebnou metodou, která představuje obrovský pokrok v medicíně. U transplantací se objevují dva hlavní problémy, riziko odmítnutí tělem, kdy imunitní systém napadá cizí orgán a druhým problémem je nedostatek vhodných orgánů. Transplantované orgány nevydrží věčně, například ledviny fungují 8-20 let, játra asi 5 let a srdce 10-20 let. V některých případech, jako u rohovkových transplantací, sice nejde o záchranu života, ale výrazně se díky nim zlepší jeho kvalita.

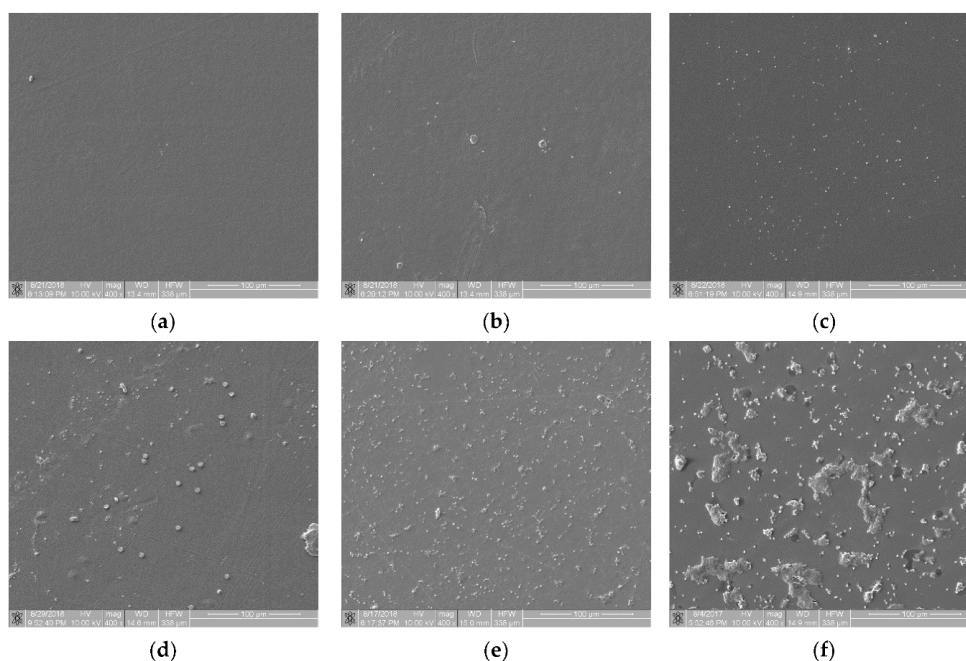
Transplantace orgánů sice stále není dokonalá věda, ale neustálý vývoj v medicíně dává pacientům s vážným selháním orgánů novou naději na lepší a delší život (Small, 2019).

Při zkoumání biologických vzorků mikroskopem SEM je nutný vzorek pokryt vrstvou zlata, aby nedošlo k poškození proteinů. Existuje však i alternativní metoda zobrazování – skenovací konfokální mikroskopie, která nevyžaduje zlatou vrstvu, ale vyžaduje označení buněk protilátkami spojenými s fluoroforem. Tato metoda je zhruba pětkrát dražší než SEM a vyžaduje uchování vzorku v inkubátoru, což může test ztížit (Gawlikowski et al., 2022).

Studie, která je detailněji popsána v článku Gawlikowski et al. (2022) se zaměřuje na novou semi-kvantitativní metodu hodnocení trombogenicity založená na snímcích adheřovaného biologického materiálu na povrchu vzorků pomocí rastrového elektronového mikroskopu (SEM). Metoda využívá parametr TR a fraktální dimenzi pro rozdělení vzorků do šesti tříd trombogenicity. (Obr. 4). Byly použity následující materiály: Bionate 55D polyuretan, polyetherether keton (PEEK), surové a TiN vrstvou potažené slitiny Ti6Al7Nb, slinutá oxid zirkoničitý stabilizovaný yttriem ($ZrO_2 + Y_2O_3$), sklo potažené kolagenem, bakteriální celulóza, kopolymer poly(ethyltereftalátu) (PET) a dimer kyseliny linolové (DLA) s obsahem 65 % hm a 70 % hmotn. PET (PET-DLA 65 % a PET-DLA 70 %). Vzorky s viditelným mechanickým poškozením a jinými artefakty byly odstraněny. Zbývající snímky ($n = 31$) byly rozděleny do šesti tříd trombogenicity v závislosti na stupni pokrytí povrchu pláty a jejich agregáty (Gawlikowski et al., 2022) :

- Třída 0: Velmi nízký stupeň trombogenicity – oddělené trombocyty s nízkou diverzitou a absencí agregátů (Obr. 4a)
- Třída 1: Nízký stupeň trombogenicity – asi deset přilnutých krevních destiček bez agregátů (Obr. 4b)
- Třída 2: Nízký stupeň trombogenicity – několik desítek trombocytů, které mohou tvořit malé, oddělené agregáty (Obr. 4c)
- Třída 3: Průměrný stupeň trombogenicity – agregáty s vyšší trombogenicitou než jednotlivé trombocyty (Obr. 4d)
- Třída 4: Vysoký stupeň trombogenicity – vzorek pokrytý diferencovaným materiálem s propojenými objekty (Obr. 4e)

- Třída 5: Velmi vysoký stupeň trombogenicity – vysoce diferencované trombocyty tvořící četné propojené agregáty (Obr. 4f)



Obrázek 4: Povrchy vzorků v jednotlivých třídách trombogenicity: a) třída 0, $TR=0,051$ (Bionate 55D, negativní kontrola); třída 1, $TR= 0,531$ ((PET-DLA 65 % před biodegradací); c) třída 2, $TR=0,892$ ((PET-DLA 70 % před biodegradací); d) třída 3, $TR= 1,430$ (PET-DLA 65 % po biologickém rozkladu); e) třída 4, $TR= 1,748$ (PET-DLA 70 % po biodegradaci); třída 5, $TR= 5,639$ (kolagenem potažené sklo, pozitivní kontrola) (Gawlikowski et al., 2022)

Metoda byla validována na široké škále materiálů, včetně polyuretanů, slitin titanu, polymerů a keramiky. Bylo definováno šest tříd trombogenicity na základě hodnot parametrů TR a fraktální dimenze. Nejlepší trombogenní vlastnosti měly polyuretany Bionate 55D, PET-DLA 65% a slitina titanu Ti6Al7Nb s antikoagulační vrstvou TiN. Trombogenita PET-DLA 65% se zhoršila po 6 měsících biodegradace v SBF (stimulovaná tělní tekutina). PEEK a keramika ZrO₂ + Y₂O₃ vykazovaly vyšší trombogenitu. Všechny testované materiály měly nižší trombogenitu než pozitivní kontrola. V budoucnu autoři plánují porovnat tuto metodu s jinými metodami pro výpočet fraktální dimenze (Gawlikowski et al., 2022).

3.2 Adsorpce bílkovin

Prvním krokem při styku biomateriálů s biologickým prostředím *in vitro* i *in vivo* je adsorpce proteinů (Deng et al., 2021). Adsorpce proteinů na cizích površích je komplexní proces, který závisí na mnoha faktorech, včetně vlastností povrchu a typu proteinu (Kuchinka et al., 2021).

Proces adsorpce začíná adsorpcí malých a hojnějších proteinů (albumin). Albumin, díky své nižší molekulové hmotnosti (LMW), činí 66 kDa a vysoké koncentraci v plazmě, která je

mezi 3,5-5 g/dl. Díky těmto vlastnostem dominuje v adsorpčních vrstvách. Proteiny s vyšší molekulovou hmotností (HMW), méně hojnější a s vyšší afinitou k povrchu mohou vytlačit menší proteiny z adsorpční vrstvy. Vromanův efekt, ukazuje posloupnost adsorpce proteinů od menších k větším, kdy albumin ustupuje imunoglobulinům, fibrinogenu a vysokomolekulárnímu kininogenu (HMWK). Tento efekt je výrazný na hydrofilním povrchu, zatímco hydrofobní povrchy vedou k nevratné adsorpci proteinů (Kuchinka et al., 2021). Rychlá adsorpce proteinů, jako je fibrinogen a vWF, vede k adhezi destiček. Aktivace koagulační kaskády začíná adsorpcí faktoru XII na povrchu implantátu a jeho následnou autoaktivací. Aktivovaný FXIIa aktivuje FXI, čímž se iniciuje série proteolytických reakcí vedoucích k tvorbě trombinu. Trombin pak přeměňuje fibrinogen na fibrin, který tvoří sraženinu s aktivovanými destičkami (Gegenschatz-Schmid et al., 2022).

Adsorpce proteinů je ovlivněna vlastnostmi povrchu, jako jsou hydrofobnost, povrchový náboje a přítomnost nukleofilních skupin (Sperling et al., 2017). Přítomnost hydrofilních domén na povrchu mnoha plazmatických proteinů a jejich hydrofobního jádra umožňuje jejich interakci s povrchy o různých vlastnostech. Adsorpce a konformační změny proteinů jsou ovlivněny jejich velikostí, přičemž větší proteiny mají vyšší tendenci k adsorpci a rozkladu. Hydrofobní a hydrofilní povrchy se liší v interakci s proteiny. Hydrofobní povrchy, jako je PTFE (Kuchinka et al., 2021), polyethylen, PMP, PCL a PDMS mají nízkou povrchovou energii, která způsobuje silnou vazbu s vodou. To způsobuje rychlou adsorpci bílkovin z krve na povrch materiálu během několika sekund (Quandt et al., 2022), což vede k adhezi a aktivaci destiček (Sperling et al., 2017). Naopak, hydrofilní povrchy mají tendenci k nižší adsorpci proteinů díky odpudivým silám způsobeným přítomností vrstvy vody na povrchu materiálu. Pokud je tato vrstva vody stabilizována pomocí polárních interakcí, jako jsou například vodíkové můstky, dochází k tzv. odpudivé hydratační síle, což znamená, že adsorpce proteinů je termodynamicky potlačena (Kuchinka et al., 2021).

Negativní náboj povrchu spouští automatickou aktivaci FXII na FXIIa, což je počátečním krokem vnitřní dráhy srážení, vedoucí k aktivaci trombinu a tvorbě fibrinové sítě. Nicméně v komplexním prostředí, jako je krevní plazma, je účinnost aktivace FXIIa na hydrofobních površích pravděpodobně omezena konkurenční vazbou jiných proteinů. (Sperling et al., 2017). Náboj materiálu rozhoduje o tom, jak se proteiny adsorbují na hydrofilní povrchy. Negativně nabitě povrchy obvykle vedou k nižší adsorpci proteinů než pozitivně nabitě povrchy. Důvodem je záporný celkový náboj mnoha proteinů při fyziologickém pH, který vytváří odpudivou sílu. Povrchy s kladným nábojem adsorpci proteinů silně zvyšují a mohou také způsobovat jejich

konformační změny. I přes celkovou odpuzující sílu proti povrchu, kterou vytváří opačně nabitá proteinová doména, může k adsorpci bílkovin dojít díky přitažlivým silám mezi opačně nabitými proteinovými doménami a povrchem (Kuchinka et al., 2021). Dále, přítomnost proteinů nebo nukleofilních skupin na povrchu podporuje přijetí komplementu C3b. I když je adsorbováno jen málo C3b, dochází k vytvoření komplexu vázaného na povrchu s proteolytickou aktivitou. Tento komplex štěpí cirkulující C3 komplement pomocí mechanismu "tick-over" na další C3b, který se adsorbuje a způsobuje další kontaminaci a aktivaci koagulace a zánětu.(Quandt et al., 2022).

Topografie povrchu, a to v nanometrovém měřítku, ovlivňuje adsorpci proteinů. Texturovaný povrch s větší plochou váže více proteinů než hladký povrch. Hrubé povrchy s mikroskopickými a nanometrickými nerovnostmi vedou ke zvětšení povrchové plochy a tím i ke zvýšené adsorpci proteinů. Naopak hladké a leštěné povrchy s proteiny interagují méně (Kuchinka et al, 2021).

3.3 Aktivace destiček

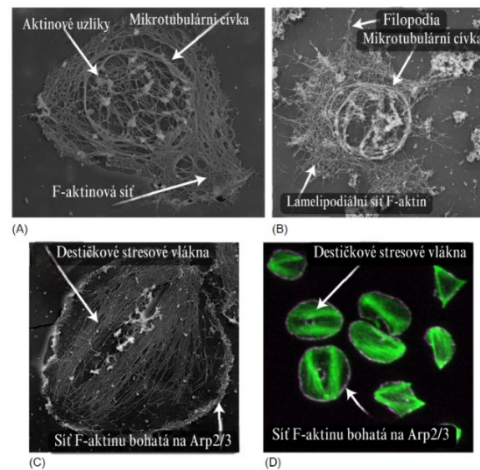
Krevní destičky mají schopnost měnit v reakci na poranění cévní stěny nebo na cizí látky. Když jsou aktivovány, probíhá morfologická transformace, při které se jejich tvar mění z diskového na kulatý s výběžky. Tento proces, spuštěný zvýšením hladiny vápníku uvnitř buňky, nastává během několika sekund a má vliv na různé vlastnosti buněk, jako jsou optické, hydrodynamické a mechanické vlastnosti (Moskalensky et al., 2018). Krevní destičky, aktivované vazbou na povrchové receptory, procházejí rychlou a komplexní změnou struktury, která je nezbytná pro hemostatickou reakci. Tato změna zahrnuje aktivaci signálních drah, sekreci obsahu granulí, tvorbu a uvolňování tromboxanu, aktivaci hlavních povrchových glykoproteinů a integrinů a reorganizaci cytoskeletu (Thomas, 2019).

Proces tvorby krevní sraženiny začíná vázáním krevních destiček na von Willebrandův faktor, což aktivuje destičky přes GPVI vazbu na kolagen. (Schurr et al., 2019). Aby aktivované krevní destičky mohly změnit tvar a rozšířit se, musí dojít k rychlé přestavbě a reorganizaci jejich cytoskeletu v klidových destičkách. Ačkoli spektrinový a mikrotubulární cytoskelety hrají klíčovou roli v regulaci tvaru krevních destiček (Thomas, 2019), po aktivaci destiček vyvolané agonistou dochází k rychlému přeuspořádání cytoskeletu (Schurr et al., 2019). Hlavní hnací silou tohoto procesu je polymerizace aktinových filament. Schopnost krevních destiček rychle se rozprostřít po povrchu, je umožněna prostorovou a časovou regulací dostupnosti

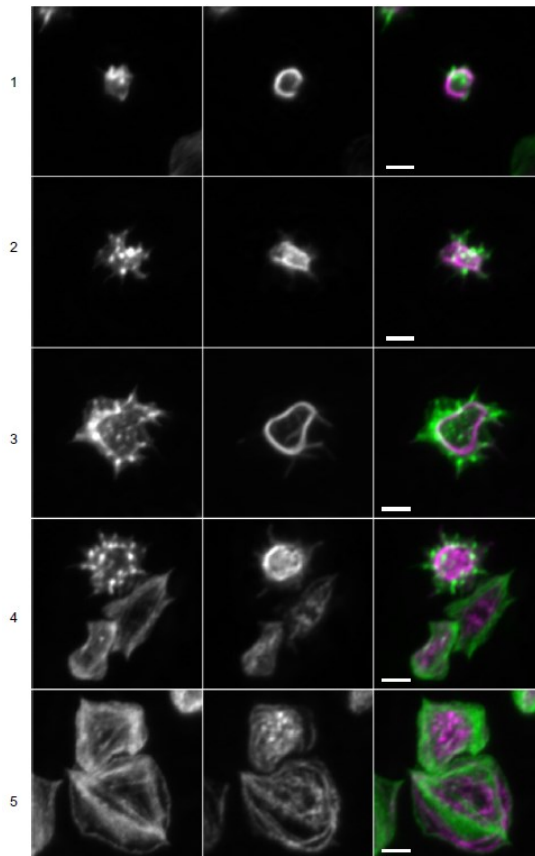
konců aktinových filamentů, a dále *de novo* nukleací a sestavováním těchto filamentů (Thomas, 2019).

Studie provedené *in vitro* ukázaly, že destičky, které přijdou do kontaktu s určitými adhezními proteiny, jako je fibrinogen (Schurr, et al., 2019), změny tvaru a začnou vyrůstat filopodia. Destička se pak zplošťuje a s uvolňováním exocytózního kanálu (OCS), vytváří lamelipodia, které vyplňují mezery mezi filopodiemi (Thomas, 2019). Lamelipodie jsou ploché, vlnité výběžky buňky obsahující krátké aktinové filameny uspořádané kolmo na sebe, prostřednictvím proteinu Arp2/3. Ve studii Schurr et al. (2019) zkoumali roli lamelipodií při tvorbě trombů *in vitro*. Výsledky ukazují, že tvorba lamelipodií, i když je důležitá pro rozprostírání destiček, není pro stabilní tvorbu trombů nezbytná (Schurr et al., 2019). Organely a granule se centralizují, čímž vzniká tvar "smaženého vejce". Tyto centrální granuly se poté spojí s OCS, což umožní uvolnění jejich obsahu. Rozprostřená krevní destička není v klidu, membránové řasení (volány) na jejím okraji, pokračují v pohybu a zároveň se tvoří stresová vlákna. Stresová vlákna pomáhají udržovat destičku roztaženou (Thomas, 2019).

Elektronová mikroskopie odhalila komplexní strukturu cytoskeletu rozpínajících se krevních destiček (Obr. 5) a pomohla objasnit procesy probíhající po jejich aktivaci. Fluorescenční mikroskopie, ačkoliv méně detailní než elektronová, se stala klíčovou metodou pro studium cytoskeletu destiček. Výhoda spočívá v dostupnosti protilátek a dalších látek umožňujících značení cytoskeletálních komponent, jako je například fluorescenční faloidin pro označení F-aktinu, a také snadná dostupnost a jednoduchost fluorescence mikroskopů. Díky těmto výhodám se značně pokročilo v poznání organizace a regulace cytoskeletu v destičkách (Obr. 6). Nové fluorescenční sondy a myší modely umožňují sledovat dynamiku cytoskeletu v živých destičkách při jejich rozpínání (Thomas, 2019).



Obrázek 5: Cytoskeletální uspořádání aktivované krevní destičky: Na obrázcích A–C jsou vidět procesy probíhající v aktivované destičce pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Obrázek D zobrazuje plně rozprostřenou destičku s obarvenými aktinovými vlákny (zeleně) a komplex Arp2/3 (fialově) pomocí metody imunofluorescence. Zvětšení A= 15000, B= 10000, C= 7500, měřítko D= 10 μ m Upraveno podle (Thomas, 2019).



Obrázek 6: Změny v cytoskeletální organizaci aktivované destičky během rozpinání: tento obrázek znázorňuje změny v cytoskeletu aktivovaných destiček během jejich rozpinání na povrchu pokrytém fibrinogenem, barveno phalloidinem k označení F-aktinu (první sloupec) a anti α -tubulinem k označení mikrotubulů (druhý sloupec), třetí sloupec znázorňuje spojení. 1. fáze: Vznik aktinových uzlů a filopodií pro adhezi a počáteční rozpinání. 2 fáze: Pokračující tvorba aktinových uzlů a filopodií, deformace mikrotubulárního svazku. 3 fáze: Vznik lamellipodií, pokles aktinových uzlů, deformace mikrotubulárního svazku, často se mikrotubulární svazky zhroutí dovnitř a tvoří zbytkovou centrální spirálu. 4 fáze: Lamellipodia dominují a tvoří se stresová vlákna pro udržení tvaru, zatímco mikrotubuly se depolymerizují. 5 fáze: Plně roztažená destička obsahuje stresová vlákna a repolymerizované mikrotubuly. Doba trvání a výraznost těchto stádií závisí na síle aktivačního signálu. Měřítko: 2,5 μ m (Thomas, 2019).

Aktivace krevních destiček je komplexní proces, který zahrnuje dramatické změny v jejich cytoskeletu. Tyto změny jsou nezbytné pro transformaci destiček z diskovitého do kulovitého tvaru, tvorbu filopodií a lamelipodií a uvolňování látek z granulí (Thomas, 2019).

Souhrn změn (Obr.7) cytoskeletu při aktivaci krevních destiček (Thomas, 2019):

A) Membránový skelet:

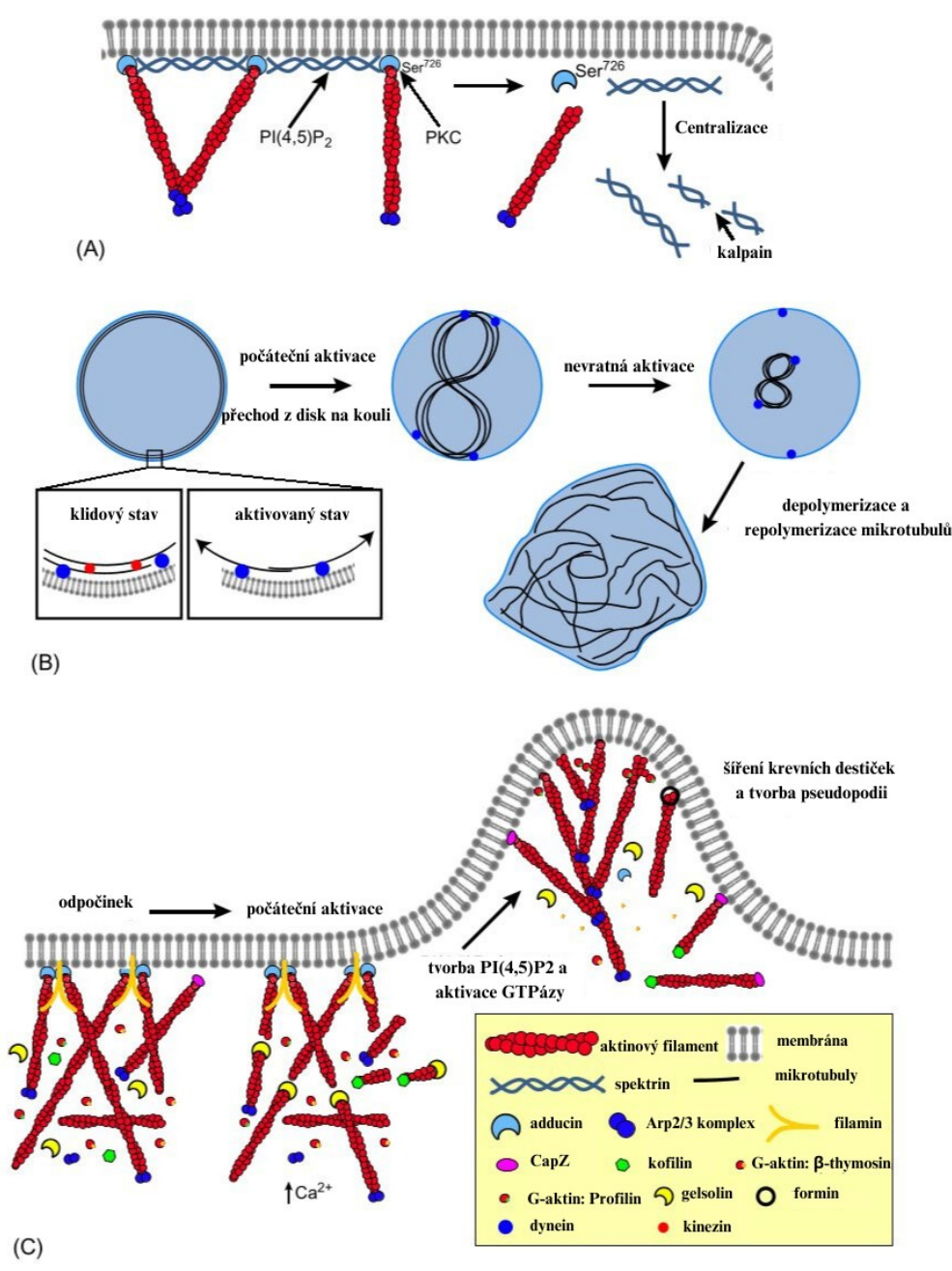
1. Oslabení vazby spektrinu na membránu v důsledku PI(4,5)P2.
2. Oddělení adducinu od spektrinu a aktinu po fosforylaci.
3. Rozklad membránového skeletu.
4. Centralizace a štěpení spektrinu kalpainem.

B) Mikrotubulární spirála:

1. Snížení aktivity kinesinu a vzájemný pohyb mikrotubulů po zvýšení $[Ca^{2+}]$.
2. Expanze mikrotubulární spirály a změna tvaru destiček na kulový.
3. Depolymerizace spirály a tvorba sítě mikrotubulů.
4. Deacetylace mikrotubulů jako modulační faktor.

C) Aktinový cytoskelet:

1. Aktivace gelsolinu a přerušení F-aktinové sítě.
2. Kofilin podporuje depolymerizaci F-aktinu.
3. Odstranění gelsolinu a CapZ z konců F-aktinu po poklesu $[Ca^{2+}]$.
4. Polymerizace aktinu a přidávání monomerů na konce F-aktinu.
5. Tvorba nových aktinových filamentů proteiny Arp2/3 a Formin.
6. Zajištění hnací síly pro filopodia, lamelipodia a pseudopodia.
7. Kontrola polymerizace a recyklace filamentů.
8. Organizace F-aktinu do dendritických polí a svazků pro šíření a adhezi zajišťují odolnost vůči smykovému napětí.



Obrázek 7: Souhrn změn cytoskeletu při aktivaci krevních destiček. Upraveno podle: (Thomas, 2019).

3.4 Souvislost aktivace destiček s imunitními mechanismy

Krevní destičky mají několik dalších funkcí. Mohou například rozpoznat patogeny, uvolňovat cytokiny, chemokiny a růstové faktory, které obsahují jejich granula, a také exprimovat molekuly buněčné adheze. Krevní destičky rozpoznávají patogeny prostřednictvím exprese toll-like receptorů (TLR). TLR jsou receptory, které jsou exprimovány na imunitních buňkách, umožňují imunitním buňkám detekovat molekulární vzory spojené s patogeny (PAMP), které nejsou normálně přítomny v hostitelských buňkách. TLR se dělí na dvě hlavní kategorie: 1) povrchová TLR, které rozpoznávají extracelulární PAMPs (TLR 1, 2, 4, 5, 6 a 10) ; 2) intracelulární TLR (TLR 3, 7, 8 a 9) (viz tab.5). Trombocytární TLR nejsou zapojeny pouze do infekčních a septických scénářů, ale reagují také na řadu molekul pocházejících z vnitřního prostředí (Carestia et al., 2023).

Bylo zjištěno, že protein s označením HMGB1 interaguje s TLR4 na krevních destičkách a následně spouští jejich aktivaci, vedoucí k tvorbě trombu. HMGB1 také může způsobit zánět a poškození orgánů (Carestia et al., 2023). Studie zkoumala roli molekuly HMGB1 uvolňované z krevních destiček v tvorbě krevních sraženin a zánětu. Zjistilo se, že HMGB1 z trombocytů hraje klíčovou roli v těchto procesech. Odstranění HMGB1 z trombocytů u myši vedlo ke snížení tvorby sraženin, zánětu a poškození orgánů po úrazu a hemoragickém šoku. Studie dále odhalila mechanismus, kterým protein HMGB1 působí na destičky, a to přes receptory TLR4 a MyD88 a aktivaci proteinu cGKI. Blokování funkce HMGB1 v trombocytech by mohlo být novou léčbou pro pacienty s poruchami srážlivosti krve a zánětem (Vogel et al., 2015).

Tabulka 5: TLR a jejich reakce při aktivaci krevních destiček. Převzato a upraveno podle: (Carestia et al., 2023)

| TLR | Ligand | Cíl/ agonista | Odezva krevních destiček |
|-----------|---|--------------------------------------|---|
| TLR1/TLR2 | Triacylované lipoproteiny | Pam3CSK4 | adheze krevních destiček, agregace, uvolňování prozánětlivých látek jako CXCL4, CD40L, VWF a P-selektin. |
| | | S. aureus | tvorba smíšených agregátů mezi krevními destičkami a polymorfonukleárními leukocyty krevní destičky indukují uvolňování NET z neutrofilů |
| TLR3 | dsRNA z virů | | hladiny TLR3 v krevních destičkách jsou velmi nízké, ale přítomnost trombinu zvyšuje povrchovou expresi TLR3 |
| TLR7 | ssRNA | EMCV (Virus encefalomyokarditidy) | Zprostředkovává tvorbu velkých agregátů krevních destiček a neutrofilů, což vede ke snížení počtu krevních destiček |
| TLR9 | Nemethylované 2'-deoxyribo (cytidin-fosfát-guanin) DNA motivy | | Exprese TLR9 je silně zvýšena v trombocytech aktivovaných trombinem |

Imunotrombóza je nový mechanismus spojující koagulaci a imunitní reakci proti bakteriím. Imunitní buňky, jako jsou monocyty a neutrofilové, rozpoznávají bakterie pomocí molekulárních vzorů spojených s patogeny (PAMP). Monocyty exprimují tkáňový faktor (TF), který spouští koagulační kaskádu. Neutrofilové uvolňují neutrofilní extracelulární pasti (NET), které tvoří síť z dekonenzované chromatinové DNA, obalena jadernými proteiny tak i granulárními proteiny, jako je myeloperoxidáza (MPO) a neutrofilní elastáza (NE). NET přímo aktivují faktor XII, vážou VWF, usnadňují aktivaci destiček pomocí histonů, podporují

koagulaci pomocí lokalizace a koncentrace enzymů, které štěpí antikoagulanty a řídí aktivaci vnější koagulační dráhy prostřednictvím vazby TF. Nesprávně regulovaná imunotrombóza může vést k poruchám srážlivosti a závažným zdravotním problémům (Carestia et al., 2023).

3.5 Metody pro studium krevních destiček

Základní screeningové testy zahrnují kompletní krevní obraz, nátěr z krve, koagulační testy (APTT, PT, TT) a test na von Willebrandův faktor, ke speciálním testům patří například průtoková cytometrie, agregometrické testy a ELISA (Lordkipanidzé et al., 2019).

3.5.1 Počítání trombocytů

Stanovení počtu trombocytů je běžným hematologickým vyšetřením (Dhakar et al., 2018). Pro počítání trombocytů existuje 6 hlavních metod, jako jsou: manuální počítání pomocí fázového kontrastního mikroskopu, impedanční analýza, optická analýza rozptylu světla/fluorescence, průtoková cytometrie, analýza na základě obrazu a počítání krevních destiček na místě (POC) (Kemble et al., 2019).

Manuální počítání krevních destiček je stále běžnou praxí v laboratořích s omezenými zdroji a ve výzkumných zařízeních, která nemají přístup k moderním přístrojům. Někdy je také nutné použít ruční metody v klinické laboratoři, zejména pokud je počet destiček nízký nebo jsou přítomny atypické destičky. Základní postup spočívá v odběru krve s antikoagulantem EDTA a jeho následném zředění a rozpadu buněk (Kemble et al., 2019). Ruční počítání na barevných nátěrech má své nevýhody, jako je proměnlivá kvalita a usazeniny barviva, které mohou ztěžovat přesné stanovení, navíc je tato technika časově náročná, což prodlužuje vyšetření trombocytů (Dhakar et al., 2018).

Moderní hematologické přístroje využívají různé metody k automatickému počítání trombocytů. Mezi ně patří změna elektrického odporu (impedance), rozptyl světla, fluorescence a zobrazování. Tyto metody poskytují rychlejší a přesnější výsledky než tradiční manuální počítání (Kemble et al., 2019). Mezi nevýhodami automatických analyzátorů patří pořizovací náklady, požadavky na kvalitu a nedostupnost v menších laboratořích (Dhakar et al., 2018). Kromě počtu trombocytů se měří i další parametry, jako je střední objem trombocytů (MPV) a šířka distribuce trombocytů (PDW). Tyto hodnoty ale závisí na konkrétním přístroji a mohou být ovlivněny typem použitého protisrážlivého činidla a dobou od odběru vzorku ke zpracování. Je důležité, aby automatické metody byly přesné a poskytovaly konzistentní výsledky i při opakovaném měření stejného vzorku (Kemble et al., 2019).

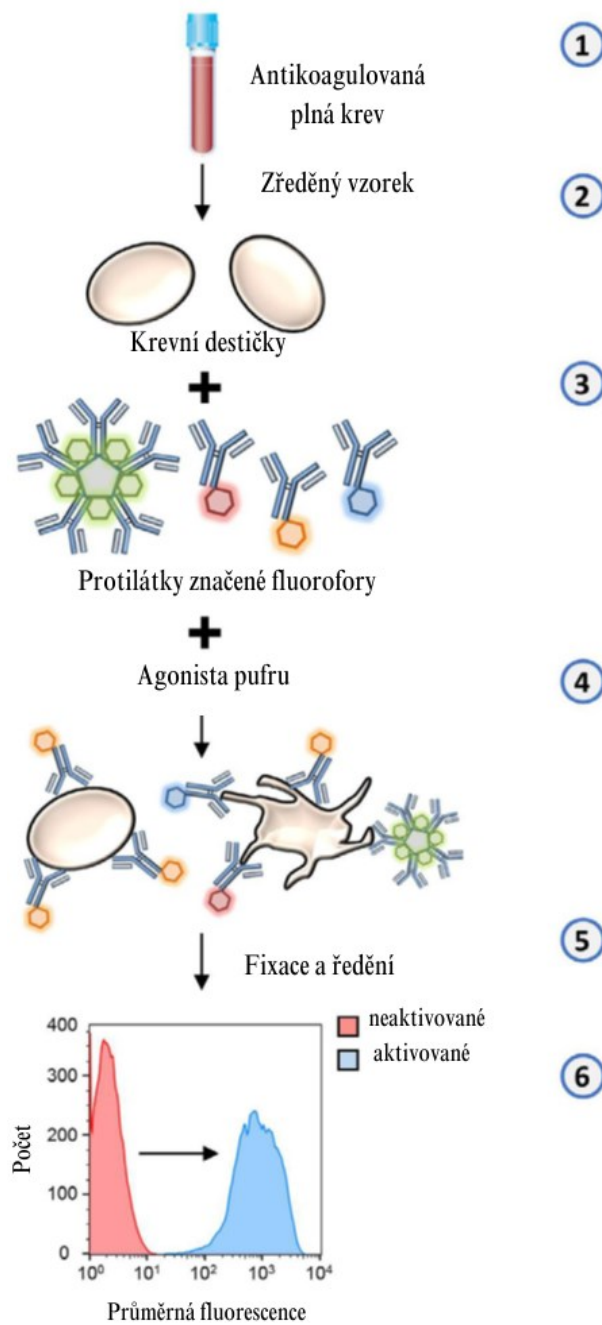
3.5.2 Funkční testy

Agregometrie s měřením světelné transmitance (LTA), také turbidimetrická nebo optická agregometrie, je známá i pod názvem Bornova agregometrie, je dlouholetá a spolehlivá metoda pro hodnocení funkce krevních destiček (Lordkipanidzé et al., 2019) Princip turbidimetrické agregometrie spočívá v monitorování změn zakalování destičkové suspenze pod vlivem agonistů při míchání vzorku v čisté nádobě při teplotě 37°C. Běžně se provádí pomocí agregometru a destiček suspendovaných v plazmě (PRP), ale lze ji také použít pro testování destiček vyplavených nebo filtrovaných pro výzkumné účely (Hayward et al., 2019). Bornova agregace je však technicky náročná, vyžaduje speciální laboratoř a její standardizace je obtížná. Na rozdíl od Bornovy agregace impedance agregace (neboli WBA) funguje na principu shlukování aktivovaných trombocytů na povrchu elektrod. Měření probíhá v celé krvi s antikoagulantem, aniž by se před testem upravoval počet trombocytů. Díky několika komerčně dostupným standardizovaným aktivátorům lze provést detailní analýzu agregace. Počítačové zpracování a použití neupravených vzorků celé krve umožňuje provedení testu přímo u pacienta (Soliman et al., 2020). I přes to, že LTA a WBA mají různé výsledky, jejich záznamy ukazují některé podobné charakteristiky (Hayward et al., 2019). Posouzení uvolňování látek z krevních destiček, tedy degranulace, hraje důležitou roli v jejich aktivaci. Pro stanovení degranulace se využívají různé testy. Základní metody zahrnují měření nukleotidů lumiagregometrem, HPLC nebo bioluminiscencí. Další možností je průtoková cytometrie s analýzou markerů uvolňujících z granulí nebo měření specifických látek jako serotonin či β -tromboglobulin pomocí testů ELISA (Lordkipanidzé et al., 2019).

Pro studium funkce a biologie trombocytů se hojně využívá průtoková cytometrie, což je výkonná a oblíbená metoda. Moderní postupy pracují s ředěnou antikoagulovanou plnou krví, která se inkubuje s různými činidly. Patří mezi ně protilátky a barviva, jež se specificky vážou na jednotlivé proteiny, granule a lipidovou membránu trombocytů. Průtoková cytometrie umožňuje měřit různé markery aktivace destiček, jako je například exprese P-selectinu, změna integrinu α IIb β 3 nebo tvorba konjugátů destiček s leukocyty (Lordkipanidzé et al., 2019). Průtoková cytometrie je vhodná pro zkoumání funkce krevních destiček v různých prostředích, ať už jde o fyziologické pufrы s promytými destičkami, plazmy, nebo dokonce přímo plnou krev. Je však důležité zmínit, že izolace krevních destiček pro analýzu (promyté destičky a trombocyty bohaté plazma) může vést k jejich umělé aktivaci. Proto se v takových případech často používají antiagregační látky (např. apyrasa, indomethacin nebo prostaglandin E (Blair et al., 2019). Průtoková cytometrie dokáže během několika sekund změřit tisíce buněk v

tekutém proudu. Měří se jejich velikost, granulaci a fluorescenci, díky čemuž dokáže jednotlivé buňky odlišit a analyzovat. Princip průtokové cytometrie spočívá v rozptylu světla a emisi fluorescence. Tyto jevy nastávají při průchodu laseru buňkami. Získaná data odhalují funkční stav buněk (Runser et al., 2021). Na Obr. 8 je znázorněn typický postup přípravy vzorku krve pro průtokovou cytometrii (Blair et al., 2019).

Průtoková cytometrie plné krve umožňuje měřit aktivaci krevních destiček jak *in vivo*, tak *in vitro*. V nepřítomnosti přidaného agonisty destiček může test stanovit aktivační stav cirkulujících destiček na základě vazby monoklonální protilátky. Po přidání agonisty do testu lze analyzovat reaktivitu cirkulujících destiček *in vitro*. Tato metoda umožňuje měřit specifické funkční odpovědi destiček, jako je změna povrchové exprese receptoru. Kromě toho je možné pomocí celkové krevní cytometrie zjišťovat agregáty monocytů a trombocytů (MPA) a prokoagulační extracelulární vezikuly pocházející z trombocytů, což jsou citlivé ukazatele aktivace trombocytů v organismu (Blair et al., 2019).



Obrázek 8: Typické schéma přípravy vzorku pro analýzu destiček průtokovou cytometrií plné krve. Popis: 1) Krev se odebírá pomocí venepunkce do vhodného antikoagulačního činidla (např. citrátu sodného), 2) Vzorek plné krve se ředí, aby se minimalizovala tvorba agregátů destiček a snížila se koncentrace požadovaných protilátek, 3) Krevní destičky jsou označeny několika monoklonálními protilátkami, které jsou označeny nekonfliktními fluorofory, 4) Panel pro průtokovou cytometrií krve kombinuje protilátky pro identifikaci destiček (např. anti-CD41, CD61 nebo CD42b) a protilátky pro vyhodnocení aktivace destiček, 5) vzorky jsou fixovány a zředěny, 6) Vzorky se analyzují na průtokovém cytometru, kompenzace se používá k zohlednění spektrálního překryvu mezi různými fluorofory a typicky se získává 10 000 signálů na vzorek. Upraveno podle: (Blair et al., 2019)

3.6 Protidestičková léčba

Trombocyty hrají klíčovou roli při srdečních chorobách, jako je ischemická choroba srdeční, stejně jako při dalších častých onemocněních, včetně mrtvice a nemocí periferních tepen (Michelson et al., 2017). Většina laboratorních testů pro sledování antiagregačních léků měří aktivitu krevních destiček během léčby, nebo jejich nepřímé ukazatele. Proto se studie zabývají korelací mezi různými testovacími systémy. Cílem je zjistit, zda lze tyto testy zaměňovat při hodnocení účinku antiagregační léčby (Gremmel et al., 2019). Léky, které brání srážení krve, se dnes dělí do čtyř klasifikací podle mechanismu účinku. Jejich hlavním cílem je zabránit shlukování krevních destiček a vzniku krevních sraženin. Hlavní nežádoucí účinek antiagregačních léčiv je zvýšené riziko krvácení. Toxicita léků proti srážení krve může nastat jak při terapeutickém dávkování, tak při předávkování. Předávkování sice není časté, ale může způsobit vážné krvácení (Pirozzi et al., 2023).

Aspirin patří mezi nejčastěji předepisované antiagregační léky. Působí inhibicí enzymu cyklooxygenázy-1 (COX-1), díky čemuž zabraňuje tvorbě látky tromboxanu A₂ (TXA₂). Právě TXA₂ hraje zásadní roli v procesu shlukování krevních destiček, které mohou ucpávat cévy a způsobovat například mrtvici nebo srdeční infarkt. Nízké dávky aspirinu užívané ústy se využívají jako prevence těchto onemocnění. Klopidoogrel a prasugrel sice nejsou aktivní hned po požití, ale v těle se přemění na látky, které trvale zablokují P2Y₁₂ receptory na krevních destičkách. Tyto receptory jsou důležité pro shlukování destiček vyvolané ADP. Ticagrelor se přímo váže na tyto receptory, ale jeho účinek je reverzibilní (Pirozzi et al., 2023). Intravenózní antiagregační látky abciximab, tirofiban a eptifibatid jsou antagonisté receptorů GPIIb-IIIa (α IIb β 3). Tyto látky okamžitě blokují receptor fibrinogenu na povrchu destičky. Mají relativně krátkou biologickou poločas rozkladu, která se pohybuje od 10 minut u abciximabu po 2 hodiny u tirofibanu a 2,5 hodiny u eptifibatidu. Dipyridamol a cilostazol jsou látky, které inhibují fosfodiesterázu a mají antiagregační účinky a také působí jako vasodilatátory (Tab. 6). V některých zemích jsou předepisovány jako součást sekundární prevence ischemické mrtvice a periferní arteriální choroby (PAD) (Gremmel et al., 2019).

Sledování funkce destiček pro kontrolu účinnosti antiagregační léčby nebo po předávkování je komplikované. Pokud má pacient problémy s krvácením, lékaři mu odeberou vzorek krve na kompletní krevní obraz, pro zjištění počtu destiček a celkového hemoglobinu. V závažných případech krvácení může být potřeba provést další testy, jako je protrombinový čas (PT), aktivovaný parciální trombinoplastinový čas (APTT) a křížovou zkoušku krve před transfúzí (Pirozzi et al., 2023).

Tabulka 6: Dostupná protideštičková léčba. Zkratky: IV: Intravenózní, CABG: Koronární bypass, CEA: Karotická endarterektomie, ACS: Akutní koronární syndrom, PCI: Perkutánní koronární intervence. Upraveno podle: (Gremmel et al., 2019).

| Mechanismus účinku | Látka | Struktura | Dávkování | Klinické použití |
|--|-------------|-------------------------------------|-----------------------------|---|
| Inhibice COX-1 | Aspirin | Kyselina acetylsalicylová | Perorálně/ denně | Onemocnění koronárních arterií, cerebrovaskulární onemocnění, onemocnění periferních tepen, stenty, CABG, CEA |
| Ireverzibilní P2Y ₁₂ antagonismus | Ticlopidin | Thienopyridin | Perorálně/ dvakrát denně | Cerebrovaskulární onemocnění, koronární stenty (v současné době se používá zřídka) |
| | Clopidogrel | | Perorálně/ denně | Předchozí infarkt myokardu, ischemická cévní mozková příhoda nebo symptomatická periferní arteriální choroba, jako monoterapie; ACS nebo koronární stentování, jako součást duální antiagregační terapie s aspirinem. |
| | Prasugrel | | Perorálně/ denně | Pacienti s ACS léčení stenty, jako součást duální antiagregační léčby s aspirinem |
| Reverzibilní P2Y ₁₂ antagonismus | Ticagrelor | Cykloperityl-triazolopyrimidin | Perorálně/ dvakrát denně | Pacienti s ACS, jako součást duální antiagregační léčby s aspirinem |
| | Cangrelor | Analog ATP | IV | PCI, pokud není předléčeno perorálním antagonistou P2Y ₁₂ |
| Inhibice GPIIb-IIIa | Abciximab | Chimerní myší lidský Fab fragment | IV | PCI |
| | Eptifibatid | Cyklický heptapeptid obsahující KGD | IV | ACS, PCI |
| | Tirofiban | Neptidové mimetikum na bázi RGD | IV | ACS, PCI |
| Inhibice PAR-1 | Vorapaxar | Tricyklický derivát himbacinu | Perorálně/denně | Předchozí infarkt myokardu, onemocnění periferních tepen |
| Inhibice PDE | Cilostazol | 2-oxocholinový derivát | Perorálně/ dvakrát denně | Onemocnění periferních tepen |
| | Dipyridamol | Pyrimidopyridin derivát | Perorálně/ dvakrát denně | Cévní mozková příhoda nebo TIA při použití s aspirinem |

4 PŘÍKLADY STUDIÍ DESTIČEK S IMPLANTÁTY

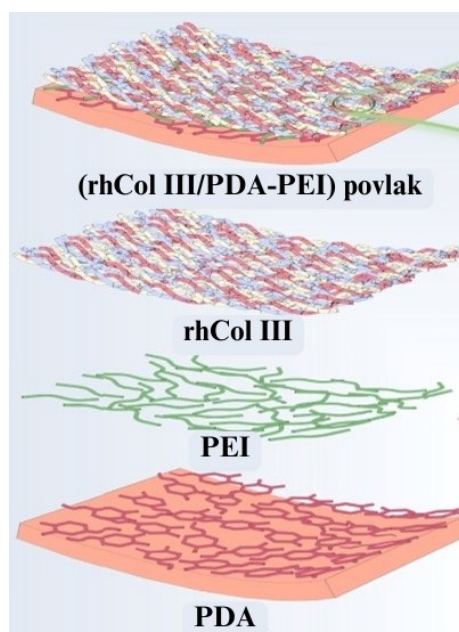
4.1 Stent

Stent je mechanické podpůrné zařízení, které se používá k rozšíření zúžené tepny. Stenty se od svého prvního použití v roce 1986 značně vyvinuly. Zlepšení designu platformy stentu a materiálů vedly k tenčím stentům s větší flexibilitou, radiální pevností a biokompatibilitou. Tyto změny vedly ke snížení míry restenózy a zlepšení klinických výsledků (Wall et al., 2018). Stenty se staly standardem v léčbě stenózy koronárních arterií. Současné stenty jsou vyrobeny z nerozložitelných kovů, jako je titan, nerezová ocel a různé slitiny kobaltu a chromu a mohou způsobovat další zdravotní problémy. Tato zařízení zůstávají trvale v těle a mohou mít negativní dopady, jako je například restenóza, omezená funkce koronárních cév a vznik rané neoaterosklerózy (Kandala, 2019). Po implantaci stentu dochází k poškození arteriální tkáně, což vyvolává řadu patologických procesů, včetně tvorby trombů a zánětu. Tyto procesy jsou spojeny s nadměrným ukládáním extracelulární matrix a růstem hladkých svalových buněk, což v konečném důsledku způsobuje intimální hyperplazii, což je klíčová příčina restenózy ve stentu (ISR) (Wu et al., 2024). Pacienti s akutním infarktem myokardu (AMI) se obvykle léčí perkutánní koronární intervencí (PCI), která zahrnuje zavedení stentu do zúžené cévy. Existují dva typy stentů: holé kovové stenty (BMS) a lékové stenty (DES). Kovové stenty jsou levnější, ale spojují se s vyšším rizikem reinfarktu. Na druhou stranu, léky uvolňující stenty mohou snížit šanci na reinfarkt, ale jsou dražší a spojené s delším obdobím léčby a vyšším rizikem komplikací, jako je například intrakraniální krvácení a gastrointestinální krvácení. Vliv typu stentu na riziko komplikací může záviset na typu AMI (STEMI vs. NSTEMI) a na dalších onemocněních pacienta (komorbiditách). Studie zkoumala účinnost stentů uvolňujících léky oproti holým kovovým stentům u pacientů s infarktem myokardu. Bylo zjištěno, že DES snižují riziko úmrtí u pacientů se STEMI (akutní infarkt myokardu s elevací ST), ale ne u pacientů s NSTEMI (infarkt myokardu bez elevace ST), a to pravděpodobně díky delšímu užívání antiagregačních léků (Cheng et al., 2021).

Vnitrostentová restenóza (ISR) je zúžení cévy, které se může objevit po zavedení stentu. Jedná se o komplikaci, která může vést k opakovaným revaskularizačním zákrokům. Vývoj stentů se zaměřuje na snížení ISR a zlepšení klinických výsledků. Mezi nejdůležitější faktory ovlivňující ISR patří: design platformy stentu, jako je: geometrie stentu (počet průsečíků trubek), tloušťka (tenčí trubka tzn. nižší ISR) a materiál platformy. Vývoj materiálů hraje klíčovou roli ve zlepšování designu stentu. Slitiny kobaltu-chromu se stávají preferovaným materiálem platformy stentu vzhledem k jejich vyšší pevnosti a biokompatibilitě ve srovnání s

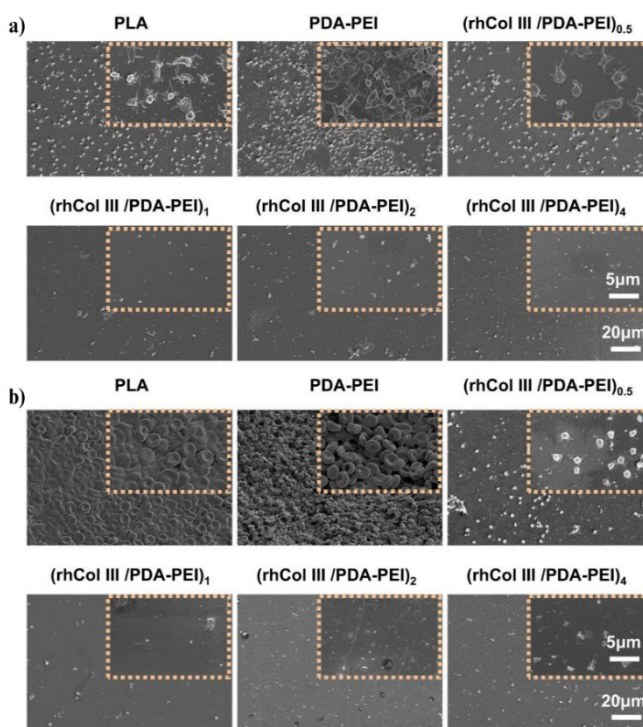
nerezovou ocelí. Přechod od nerezové oceli ke slitinám umožnil snížit tloušťku stěny stentu a zlepšit jejich manipulaci, přičemž byla zachována radiální pevnost (Wall et al., 2018). Léčba léčivem uvolňujícím stent může snížit riziko restenózy, díky lokálnímu uvolňování antihyperplazických léků (např. rapamycin, sirolimus, tranilast a everolimus), ale může způsobit zpožděné hojení endoteliálních buněk a zvýšit riziko pozdní trombózy stentu (LST), a to omezuje dlouhodobou účinnost DES. Proto se hledají nové typy stentů, které by tyto problémy neměly. Autoři Wu et al. (2024) představují návrh nového bezlékové povlaku pro stenty, který využívá pouze jednu složku, konkrétně upravený rekombinantní humanizovaný kolagen typu III (rhCol III) (Wu et al., 2024).

Vědci využili pokročilé technologie z oblasti strukturní biologie a genetického inženýrství, aby vytvořili tento speciální materiál – rekombinantní humanizovaný kolagen typu III (rhCol III). Tento materiál má vylepšené vlastnosti podporující hojení cév, tlumí zánět a zabraňuje nežádoucí aktivaci krevních destiček. Tyto vlastnosti pramení z toho, že obsahuje vysoce adhezivní fragmenty lidského kolagenu (GER a GEK) bez hydroxyprolinové sekvence, která by mohla způsobovat shlukování a aktivaci krevních destiček. Kromě toho má rhCol III vhodnou rozpustnost ve vodě, nízkou zánětlivou odezvu a pomáhá při obnově cévní tkáně. RhCol III vykazuje slibné vlastnosti pro léčbu srdečních onemocnění, včetně aterosklerózy, infarktu a chlopenních vad (Wu et al., 2024).



Obrázek 9: Funkční model a proces přípravy povlaku „one-products-multi“ (PDA- polydopamin, PEI- polyethylenimin, rhCol III- rekombinantní humanizovaný kolagen typu III). Upraveno podle: (Wu et al., 2024).

Vědci zkoumali vlastnosti povlaku bez obsahu léků, který se skládá z rekombinantního humanizovaného kolagenu typu III (rhCol III) a poly(dopaminu-ethyleniminu) (Obr. 9). Zkoumali jeho antitrombotické vlastnosti a jeho účinek na adhezi a aktivaci destiček *in vitro* a *in vivo* (Obr. 10). Testy *in vitro* ukázaly, že tyto povlaky významně snižují adhezi a aktivaci krevních destiček, což naznačuje jejich vynikající antikoagulační účinky. Tento účinek je přičítán rhCol III, který pomáhá inhibovat adhezi a aktivaci destiček. *Ex vivo* testy na arteriovenózním zkratu u králíků prokázaly, že na povrchu holého PLA a PDA-PEI se po dvou hodinách cirkulace vytvořily silné tromby, zatímco na nátěrech (rhCol III/PDA-PEI)_n (n = 1, 2, 4) se vyskytlo jen několik neaktivovaných destiček tím se dramaticky snížila tvorba trombů a zachoval průchodnost cév. Zvýšená koncentrace rhCol III v nátěru (n ≥ 1) vede k optimální inhibici destiček a zlepšené hemokompatibilitě materiálu. Naopak bylo zjištěno, že samotný PDA-PEI vyvolává silnou trombózu a nízké množství rhCol III v nátěru (rhCol III/PDA-PEI)_{0,5} může oslabit následné biologické funkce (Wu et al., 2024).



Obrázek 10: Povlaky (rhCol III/PDA-PEI)_n (n = 0,5, 1, 2 a 4) zlepšují krevní kompatibilitu. Popis obrázku: (a) Fotografie pořízené rastrovacím elektronovým mikroskopem (SEM) zachycující krevní destičky přilepené na různých površích. Detailní snímky krevních destiček na: Nepovrstveném PLA, PLA s běžným polymerním povlakem (PDA-PEI), PLA s novým typem povlaku (rhCol III/PDA-PEI)_n, měřítko: 5 a 20 μm. Výsledky kvantitativní analýzy, (b) snímky SEM trombů vytvořených na různých vzorcích po 2 hodinách krevního oběhu, měřítko: 5 a 20 μm. Převzato a upraveno z (Wu et al., 2024).

Současně probíhají studie zaměřené na vývoj kovových stentů, které se po restrukturalizaci tepny samy rozloží. Tyto stenty by pomohly otevřít ucpané tepny a udržet je průchodné do doby, než se cévy samy zhojí. Poté by se stent vstřebal bez nutnosti další operace.

Znamé materiály pro stenty, jako je hořčík a železo, se sice rozkládají, ale mohou poškozovat cévy. Zinek se jeví jako slibnější alternativa, jelikož je biokompatibilní a vstřebatelný. Slitiny zinku s vhodnou pevností a tažností budou předmětem dalších výzkumů (Kandala et al., 2019).

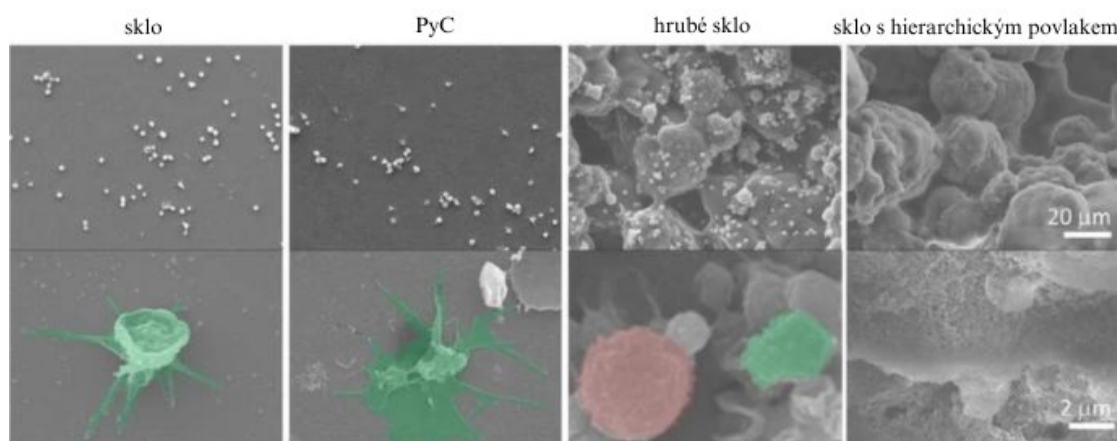
4.2 Náhrada srdeční chlopně

Každý rok se implantuje více než 300 000 srdečních chlopní, z nichž polovina jsou mechanické (Khalili et al., 2018). Srdeční chlopně, které selhávají kvůli srdečním chlopenním chorobám, jsou nahrazeny buď bioprotetickými nebo mechanickými chlopněmi (Bark et al., 2017). Výběr umělé srdeční chlopně na míru pacientovi záleží na jejich vlastnostech. Rozhodující vlastnosti chlopní jsou – jak ovlivňuje proudění krve (biofyzika) a srážení krve (hemostáza) (Tschorn et al., 2022). Mechanické srdeční chlopně (BMHV) jsou nejběžnější kvůli své odolnosti a dobré hemodynamice. Mají však více pooperačních komplikací než bioprotézy, jako je tvorba trombů, hemolýza a aktivace krevních destiček (Khalili et al., 2018). Biologické chlopně vyrobené z elastických materiálů, jako jsou chlopně z prasečího srdce nebo hovězího osrdečníku, zamezují potřebu antikoagulace, avšak mají omezenou životnost z důvodu vápenatění a opotřebení chlopně (Tschorn et al., 2022).

Mechanické srdeční chlopně (BMHV) jsou náchylné k dysfunkci způsobené tvorbou trombů a přerůstáním tkáně. Mezi výměnou chlopně a ucpáním může uplynout dlouhá doba (od 6 týdnů do 13 let) a někteří pacienti s významným zúžením chlopně mohou být zcela bez příznaků, dokud není stanovena diagnóza. Rozlišení normálně fungující a mírně dysfunkční BMHV bývá obtížné, přesto může i mírná dysfunkce vést k život ohrožujícím komplikacím. Výzkum ukázal, že dysfunkce chlopně může vést k aktivaci krevních destiček, zvyšuje riziko jejich shlukování (agregaci) a následné tvorby krevních sraženin. Toto riziko roste s mírou dysfunkce. Hlavními faktorem je vysoká úroveň turbulentního smykového napětí (nad $400 \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$). Tyto turbulence může aktivovat krevní destičky, čímž dále zvyšují riziko jejich shlukování (agregaci) a následné tvorby krevních sraženin. Takové sraženiny se mohou uvolnit a ucpat tepny, což může vést k vážným komplikacím, jako je embolie nebo mrtvice (Khalili et al., 2018). Pacienti léčení mechanickou náhradou chlopně vyžadují doživotní antikoagulační léčbu, a to s sebou nese zvýšené riziko nežádoucích událostí souvisejících s krvácením (Sun et al., 2022).

Autoři studie zkoumali superhydrofobní (SH) povlak na BMHV, povrchu s obchodním názvem Ultra-Ever Dry, který se skládá ze dvou vrstev: spodní hrubší a vrchní jemnější. Tato kombinace vytváří hierarchickou strukturu, která výrazně zvyšuje odolnost vůči vodě. Dále zjišťovali, jak krev reaguje na různé materiály (sklo, PyC a speciální nátěr), zaměřili se na

shlukování trombocytů a leukocytů (Obr. 11). Na skle a materiálu z pyrolytického uhlíku se zachytilo velké množství krevních destiček. Tyto destičky navíc změny tvar a vytvořily jakési výběžky, což značí jejich aktivaci. Na hrubém nátěru se zachytilo ještě více destiček, ale i bílých krvinek, na rozdíl od ostatních povrchů. Naopak na hierarchickém nátěru, který má dvojí strukturu, se vůbec žádné destičky ani bílé krvinky nezachytily. Výsledky tedy ukázaly, že hierarchický nátěr s odpudivými vlastnostmi vůči vodě (superhydrofobní) výrazně brání krevním destičkám a bílým krvinkám v usazování na povrchu, zatímco na ostatních testovaných materiálech k usazování docházelo (Bark et al., 2017).



Obrázek 11: Snímky skenovacího elektronového mikroskopu skla, PyC, skla s hrubým povlakem a skla s hierarchickým povlakem. Adheze destiček (zeleně) a leukocytů (červeně) na různých povrchových úpravách. Spodní řada je zvětšena 10krát více než horní řada. Upraveno podle (Bark et al., 2017).

Různé vědecké skupiny se snažily vytvořit umělé náhrady chlopní, které by co nejlépe simulovaly přirozenou tkáň. První pokusy směřovaly k použití polymerů, jako je křemík a polyuretany, kvůli jejich vhodným mechanickým vlastnostem a jasně definovanému složení. V praxi se ale ukázalo, že tyto materiály v těle nevydrží dostatečně dlouho, navíc v nich snadno vznikají krevní sraženiny a kalcifikace. Nové pokroky v syntéze polymerů vedly k vývoji nových generací polyuretanů s vylepšenými vlastnostmi v oblasti tvorby trombů a kalcifikace. Patří mezi ně například polykarbonátový uretan (PCU) a polyetheruretan-urea (PEUU). V posledních letech se zkoumají také náhražky chlopní z hydrogelů, například z polyvinylalkoholu (PVA) a poly(ethylenglykolu) (PEG). Tyto materiály jsou pružné a mají dobré biologické vlastnosti. Problém u hydrogelů je jejich postupné rozkládání a nedostatek dat o dlouhodobé trvanlivosti (Sun et al., 2022).

Srdeční chlopně, které se dnes používají při operacích, mají omezenou životnost. Proto se studie „A biomimetic multilayered polymeric material designed for heart valve repair and replacement“ zaměřila na výrobu nového materiálu (BMM). Je to speciální materiál, který napodobuje strukturu a funkci původních srdečních chlopní. BMM je třívrstvá polymerní

struktura. PCU-pěna je vyztužena F-mimickou V-mimickou vrstvou, tyto vrstvy obsahují zabudovaná a zarovnaná vlákna PCL. PCU je známý svou bistabilitou a biokompatibilitou a používá se pro výrobu chlopní. Ve srovnání s běžným poly(etheruretanem) a poly(etherurethanmočovinou), má PCU lepší odolnost vůči degradaci za biologických podmínek. BMM byl testován na adhezi proteinů (BSA test), zjistilo se, že BMM má v porovnání se třemi komerčně dostupnými vzorky nižší úroveň adsorpce proteinů. Materiál vykazuje nižší povrchové napětí a větší schopnost přijímat vodu, což pomáhá snižovat adsorpci proteinů. Dalším faktorem, který brání usazování bílkovin na BMM, je jeho hladký a nepropustný povrch. Kromě toho bylo zkoumána odolnost materiálu vůči kalcifikaci, která může ovlivnit jeho trvanlivost. Testy (30denní) prokázaly, že BMM má nižší schopnost akumulovat Ca^{2+} než běžné náplasti, což je důležité z hlediska dlouhodobého použití v aplikacích, jako jsou srdeční chlopně (Sun et al., 2022).

4.3 Osseointegrované implantáty

Osseointegrace je proces, kdy se implantát přímo spojí s živou kostní tkání. Nejčastěji využívané kovy jsou titan a jeho slitiny, kobaltu, tantalu, nerezové oceli a zirkonia (Oltean-Dan et al., 2021).

Osseointegrované protézy jsou často využívány po amputaci nadkolenní končetiny (transfemorální amputaci). Transfemorální amputace se tradičně léčí systémem protézového pouzdra, která spojuje zbytek končetiny s protézou. Tato metoda má však nevýhody, jako je podráždění kůže, dekubity a nepohodlí. Navíc není vhodná pro krátké nebo těžce zraněné zbytky stehenní kosti. Moderní alternativou je osteointegrovaná protéza, která přímo spojuje umělou končetinu s kostí. Pro tyto implantáty se nejčastěji používá slitina titanu, pro svou biokompatibilitu, odolnost vůči korozi a opakovaným zátěžím (Lu et al., 2022). Slitina Ti-6Al-4V je preferovaným materiálem pro aditivně vyráběné osseointegrované implantáty, kvůli mechanickým vlastnostem a biokompatibilitě. Naopak ale může způsobit síťové napětí a cytotoxicitu. Proto se zkoumají i jiné titanové slitiny, jako je například slitina Ti-Nb-ZrMn typu beta, Ti25Nb-13Ta-5Zr a Ti-Al-Nb. Pro osseointegrované implantáty se hledali vhodné biodegradabilní kovové materiály pro infiltraci. Tři zkoumané možnosti jsou železo (Fe), hořčík (Mg) a zinek (Zn). Slitiny na bázi Fe a Mg se potýkají s problémy, jako je tvorba oxidů a zrychlená koroze. Čistý zinek se ale rozkládá pomalu, proto se do něj přidává Fe a další legující prvky (Gabay et al., 2021). Mezi hlavní implantátové systémy integrované přímo do kosti patří OPRA (Benca et al., 2023). Osseointegrace (OI) umožňuje přímé mechanické spojení, které zajišťuje oproti systému s pouzdrům lepší pohyblivost kloubu a snazší ovládání protézy. Další

výhody této metody jsou snížení infekce a senzorická zpětná vazba. Naopak nevýhodou je dlouhá rehabilitace (18 měsíců), která je nezbytná pro bezpečné spojení implantátu s kostí. Během celého procesu rehabilitace je pak zásadní stabilita implantátu, neboť může vést ke zlomení či uvolnění implantátu (Lu et al., 2022).

OPRA je významný implantátový systém umožňující integrovat protézy přímo do kosti. Chirurgický postup zahrnuje otevření intramedulárního kanálu, postupné vrtání, řezání závitů a zavedení fixačního prvku. Klíčovým aspektem je správné umístění úchyty (fixátoru), aby se minimalizovalo ztenčení kortikální kosti a snížilo riziko zlomení. V současnosti existují dvě hlavní metody usnadňující chirurgický zákrok: roboticky asistovaná chirurgie a pacientem specifická instrumentace (PSI). Zatímco roboticky asistovaná chirurgie zvyšuje přesnost, je omezena vysokými náklady a složitostí (Benca et al., 2023). Dalším osseointegračním implantátem je dentální implantáty (endosseální implantát) slouží k funkční a estetické rehabilitaci ztráty nebo vrozeného nedostatku jednoho nebo více zubů. Tyto implantáty se uchycují přímo do kosti horní či dolní čelisti (proces zvaný osseointegrace), To umožňuje implantátům pevně a stabilně držet zubní korunky, můstky nebo celé zubní oblouky (Fiorillo et al., 2022).

ZÁVĚR

Tato práce se zaměřila na interakci mezi krevními destičkami a implantáty. Práce shrnula aktuální poznatky o morfologii, funkci a studium krevních destiček, se zaměřením na jejich chemotaktické vlastnosti. Dále byl zkoumán proces tvorby krevních destiček a jejich interakce s umělými materiály.

Výsledky shrnuté v práci prokazují, že aktivace trombocytů je komplexní proces, který je ovlivněn řadou faktorů. Z implantátů byla diskutována problematika trombogenity používaných biomateriálů, zejména pro stenty a náhrady srdečních chlopní. Popsána byla nová semi-kvantitativní metoda pro hodnocení trombogenity, tj. náchylnost k tvorbě krevních sraženin. Tato metoda ukázala, že polyuretany Bionate 55D, PET-DLA 65% a slitina titanu Ti6Al7Nb s antikoagulační vrstvou TiN mají nejlepší trombogenní vlastnosti, tedy nízký stupeň trombogenicity. Byli zkoumány protideštičkové léčby, navzdory přínosům antiagregačních léčiv je důležité zdůraznit jejich možné nežádoucí účinky, zejména riziko krvácení. Sledování funkce destiček prostřednictvím laboratorních testů je klíčové pro identifikaci a řešení potenciálních komplikací. Dále byly rozebrány typy stentů, včetně holých kovových stentů (BMS) a lékových stentů (DES). Byl také představen nový typ bezlékového povlaku pro stenty, který využívá rekombinantní humanizovaný kolagen typu III (rhCol III). Práce popisuje mechanické a bioprotézové chlopně a jejich vlastnosti. Dále se zaměřila na studii zkoumající superhydrofobní (SH) povlak na mechanických chlopních, který ukázal, že hierarchický nátěr s odpudivými vlastnostmi vůči vodě (superhydrofobní) výrazně omezuje usazování krevních destiček a bílých krvinek na povrchu. V neposlední řadě byla popsána studie zaměřená na výrobu a přínos nového biomimetického materiálu pro srdeční chlopně.)

POUŽITÁ LITERATURA

- THOMAS, Steven G. The Structure of Resting and Activated Platelets. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, 2019, s. 47-77. ISBN 978-0-12-813456-6.
- GREMMEL, Thomas, Andrew L. FRELINGER a Alan D. MICHELSON, 2016. Platelet physiology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 43(3), 191-204 [cit. 2024-04-03]. ISSN 0094-6176. Dostupné z: doi:10.1055/s-0035-1564835.
- CHOTTOVÁ DVOŘÁKOVÁ, Magdaléna a Eliška MISROVÁ, 2023. *Fyziologie krve a základy imunity*. 1. Karolinum. ISBN 978-80-246-3864-5.
- PULCER, Martin, Jana ZUCHNICKÁ, Soňa KOLÁŘOVÁ, Markéta RYZÍ a David STEJSKAL, 2022. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Ostrava: Ostravská univerzita, Lékařská fakulta. ISBN 978-80-7599-322-9.
- KŘÍŽKOVÁ, Věra. *Blood and blood components: hematopoiesis, selected methods used in cytology, histology, and hematology*. Prague: Karolinum Press, 2021. ISBN 978-80-246-4709-8.
- DULÍČEK, Petr. *Poruchy hemostázy v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, 2022. ISBN 978-80-271-3337-6.
- MACHLUS, Kellie R. a Joseph E. ITALIANO, 2019. Megakaryocyte Development and Platelet Formation. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 25-46. ISBN 978-0-12-813456-6.
- KLAESKE, Kristin, Anneke BRADE, Sandra EIFERT, et al., 2023. The Glycoprotein (GP)Ib-IX-V Complex on Platelets: GPIb α Protein Expression Is Reduced in HeartMate 3 Patients with Bleeding Complications within the First 3 Months. *International journal of molecular sciences* [online]. Switzerland: MDPI, 24(6), 5639 [cit. 2024-02-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24065639.
- ENOMOTO, Yukiko, Takashi ONUMA, Takamitsu HORI, et al., 2023. Synergy by Ristocetin and CXCL12 in Human Platelet Activation: Divergent Regulation by Rho/Rho-Kinase and Rac. *International journal of molecular sciences* [online]. Switzerland: MDPI, 24(11), 9716 [cit. 2024-02-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24119716.
- LI, Renhao, 2019. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 193-211. ISBN 978-0-12-813456-6.
- KOO, Chek Ziu, Alexandra L MATTHEWS, Neale HARRISON, et al., 2022. The Platelet Collagen Receptor GPVI Is Cleaved by Tspan15/ADAM10 and Tspan33/ADAM10 Molecular Scissors. *International journal of molecular sciences* [online]. Switzerland: MDPI, 23(5), 2440 [cit. 2024-03-01]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23052440.
- HAINING, Elizabeth J., Phillip LR NICOLSON, Marie-Blanche ONSELAER, et al., 2019. GPVI and CLEC-2. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 213-226. ISBN 978-0-12-813456-6.
- BLEDZKA, Kamila, Jun QIN a Edward F. PLOW, 2019. Integrin α IIb β 3. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 227-241. ISBN 978-0-12-813456-6.

ŞENTÜRK, Murat, 2023. *Chemokines Updates*. IntechOpen, 138 s. ISBN 978-1-80356-175-2. ISSN 2632-0983. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.100950.

CISOŇ-JUREK, Sylwia, Paulina CZAJKA-FRANCUZ, Tomasz FRANCUZ a Jerzy WOJNAR, 2019. Chemokines – role in inflammatory and cancer diseases. *Postepy Hig Med Dosw* [online]. Walter de Gruyter, 73, 372-386 [cit. 2024-01-30]. ISSN 0032-5449. Dostupné z: doi:10.5604/01.3001.0013.3669.

STŘÍŽ, Ilja a Vladimír HOLÁŇ, 2015. *Cytokiny v klinické medicíně*. 1. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-427-2.

LEGLER, Daniel F. a Marcus THELEN, 2016. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia* [online]. Swiss Chemical Society, 70(12), 856- 859 [cit. 2024-01-30]. ISSN 0009-4293. Dostupné z: doi:10.2533/chimia.2016.856.

HUGHES, Catherine E. a Robert J. B. NIBBS, 2018. A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal* [online]. England: Blackwell Publishing, 285(16), 2944-2971 [cit. 2024-04-09]. ISSN 1742-464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.14466.

LIU, Dan a Yu CAO, 2018. Chemokine CC-motif ligand 2 participates in platelet function and arterial thrombosis by regulating PKC α -P38MAPK-HSP27 pathway. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* [online]. Netherlands: Elsevier B.V, 1864(9), 2901-2912 [cit. 2024-02-01]. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2018.05.025.

TAKADA, Yoko K, Masaaki FUJITA a Yoshikazu TAKADA, 2022. Pro-Inflammatory Chemokines CCL5, CXCL12, and CX3CL1 Bind to and Activate Platelet Integrin α IIb β 3 in an Allosteric Manner. *Cells (Basel, Switzerland)* [online]. Basel: MDPI, 11(19), 3059 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11193059.

DICKHOUT, Annemiek, Dawid M. KACZOR, Alexandra C. A. HEINZMANN, Sanne L. N. BROUNS, et al., 2021. Rapid Internalization and Nuclear Translocation of CCL5 and CXCL4 in Endothelial Cells. *International journal of molecular sciences* [online]. Basel: MDPI, 22(14), 7332 [cit. 2024-03-04]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22147332.

FOX, James M, Fahima KAUSAR, Amy DAY, et al., 2018. CXCL4/Platelet Factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration. *Scientific reports* [online]. England: Nature Publishing Group, 8(1), 9466-15 [cit. 2024-02-12]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-27710-9.

NEVZOROVA, Tatiana A, Elmira R MORDAKHANOVA, Amina G DAMINOVA, et al., 2019. Platelet factor 4-containing immune complexes induce platelet activation followed by calpain-dependent platelet death. *Cell death discovery* [online]. United States: Springer Nature B.V, 5(1) [cit. 2024-02-13]. ISSN 2058-7716. Dostupné z: doi:10.1038/s41420-019-0188-0.

SOTIRI, Irini, Matthew ROBICHAUD, David LEE, et al., 2019. BloodSurf 2017: News from the blood-biomaterial frontier. *Acta biomaterialia* [online]. England: Elsevier, 87, 55-60 [cit. 2024-02-15]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2019.01.032.

GAWLIKOWSKI, Maciej, Roman MAJOR, Barbara MIKA, Dariusz KOMOROWSKI, Karolina JANICZAK, et al., 2022. Semi-Quantitative Method of Assessing the

Thrombogenicity of Biomaterials Intended for Long-Term Blood Contact. *Materials* [online]. Switzerland: MDPI, 16(1), 38 [cit. 2024-02-27]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma16010038.

HUANG, Tao, Lijing YANG, Chunxiang XU, Cheng XU, Qingke ZHANG, Jinshan ZHANG a Zhenlun SONG, 2024. Effect of Extrusion on Mechanical Property, Corrosion Behavior, and In Vitro Biocompatibility of the As-Cast Mg-Zn-Y-Sr Alloy. *Materials* [online]. 17(6), 1297 [cit. 2024-03-12]. Dostupné z: doi:10.3390/ma17061297

SMALL, Cathleen, 2019. *Organ Transplants*. Cavendish Square Publishing. ISBN 9781502643698.

DENG, Fanyan, Wanyin ZHAI, Yue YIN, Chao PENG a Congqin NING, 2021. Advanced protein adsorption properties of a novel silicate-based bioceramic: A proteomic analysis. *Bioactive materials* [online]. Elsevier B.V, 6(1), 208-218 [cit. 2024-03-05]. ISSN 2452-199X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioactmat.2020.08.011.

KUCHINKA, Janna, Christian WILLEMS, Dmitry V TELYSHEV a Thomas GROTH, 2021. Control of Blood Coagulation by Hemocompatible Material Surfaces—A Review. *Bioengineering* [online]. Switzerland: MDPI, 8(12) [cit. 2024-02-15]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering8120215.

GEGENSCHATZ-SCHMID, Katharina, Stefano BUZZI, Jonas GROSSMANN, et al., 2022. Reduced thrombogenicity of surface-treated Nitinol implants steered by altered protein adsorption. *Acta biomaterialia* [online]. England: Elsevier, 137, 331-345 [cit. 2024-02-23]. ISSN 1742-7061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2021.10.022.

SPERLING, Claudia, Manfred F MAITZ, Simona GRASSO, Carsten WERNER a Sandip M KANSE, 2017. A Positively Charged Surface Triggers Coagulation Activation Through Factor VII Activating Protease (FSAP). *ACS applied materials & interfaces* [online]. United States: American Chemical Society, 9(46), 40107-40116 [cit. 2024-03-06]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.7b14281.

QUANDT, Jonas, Manuela GARAY-SARMIENTO, Lena WITZDAM, et al., 2022. Interactive Hemocompatible Nanocoating to Prevent Surface-Induced Coagulation in Medical Devices. *Advanced materials interfaces* [online]. Weinheim: Wiley Subscription Services, 9(33) [cit. 2024-03-06]. ISSN 2196-7350. Dostupné z: doi:10.1002/admi.202201055.

MOSKALENSKY, Alexander E, Maxim A YURKIN, Artem R MULIUKOV, Alena L LITVINENKO, et al., 2018. Method for the simulation of blood platelet shape and its evolution during activation. *PLoS computational biology* [online]. United States: Public Library of Science, 14(3), e1005899-e1005899 [cit. 2024-03-06]. ISSN 1553-7358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1005899.

SCHURR, Yvonne, Andreas SPERR, Julia VOLZ, et al., 2019. Platelet lamellipodium formation is not required for thrombus formation and stability. *Blood* [online]. 134(25), 2318-2329 [cit. 2024-03-07]. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2019002105.

CARESTIA, Agostina, Laura C. GODIN a Craig N. JENNE, 2023. Step up to the platelet: Role of platelets in inflammation and infection. *Thrombosis Research*. 182-194. ISSN 0049-3848.

- VOGEL, Sebastian, Rebecca BODENSTEIN, Qiwei CHEN, et al., 2015. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *The Journal of clinical investigation* [online]. United States: American Society for Clinical Investigation, 125(12), 4638-4654 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI81660.
- LORDKIPANIDZÉ, Marie, Anne-Mette HVAS a Paul HARRISON, 2019. Clinical Tests of Platelet Function. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 593-608. ISBN 978-0-12-813456-6.
- DHAKAR, Suman, Preeti DIWAKER, Priyanka GOGOI, Bharat SINGH a Surender KUMAR, 2018. Platelet Count Estimation using Unstained and Stained Peripheral Blood Smears: A Comparative Study. *Journal of clinical and diagnostic research* [online]. JCDR Research and Publications, 12(7), EC14-EC16 [cit. 2024-03-10]. ISSN 2249-782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2018/35640.11816
- KEMBLE, Samuel, Carol BRIGGS a Paul HARRISON, 2019. Platelet Counting. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 581-591. ISBN 978-0-12-813456-6.
- HAYWARD, Catherine P.M. a Karen A. MOFFAT, 2019. Platelet Aggregation. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 609-626. ISBN 978-0-12-813456-6.
- SOLIMAN, Mohamed a Matthias HARTMANN, 2020. Multiplate® Platelet Aggregation Findings Are Dependent on Platelet Count but Can Be Corrected by Use of a Ratio. *Applied sciences* [online]. MDPI, 10(22), 7971 [cit. 2024-03-10]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app1022797.
- BLAIR, Thomas A., Andrew L. FRELINGER a Alan D. MICHELSON, 2019. Flow Cytometry. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 627-651. ISBN 978-0-12-813456-6.
- RUNSER, Anne, Caroline SCHANING, Frédéric ALLEMAND a Jean AMIRAL, 2021. An Optimized and Standardized Rapid Flow Cytometry Functional Method for Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Biomedicines* [online]. Switzerland: MDPI, 9(3), 296 [cit. 2024-03-11]. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines9030296.
- MICHELSON, Alan D. a Deepak L. BHATT, 2017. How I use laboratory monitoring of antiplatelet therapy. *Blood* [online]. 130(6), 713-721 [cit. 2024-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-742338>.
- GREMMEL, Thomas, Deepak L. BHATT a Alan D. MICHELSON, 2019. Laboratory Monitoring of Antiplatelet Therapy. In: *Platelets*. 4rd ed. Academic Press, s. 653-682. ISBN 978-0-12-813456-6.
- PIROZZI, Elisa J. a Brandon K. WILLS, 2023. Antiplatelet Drug Toxicity. In: *StatPearls* [online]. StatPearls Publishing [cit. 2024-03-11]. Dostupné z: ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546665/
- WALL, Gerard, Halina PODBIELSKA a Magdalena WAWRZYNSKA, 2018. *Functionalised Cardiovascular Stents*. Woodhead Publishing. ISBN 978-0-08-100496-8.

KANDALA, Bala Subramanya Pavan Kumar, Guangqi ZHANG, Tracy M. HOPKINS, et al., 2019. In Vitro and *In Vivo* Testing of Zinc as a Biodegradable Material for Stents Fabricated by Photo-Chemical Etching. *Applied sciences* [online]. Basel: MDPI, 9(21), 4503 [cit. 2024-03-13]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9214503.

WU, Haoshuang, Li YANG, Rifang LUO, et al., 2024. A drug-free cardiovascular stent functionalized with tailored collagen supports in-situ healing of vascular tissues. *Nature communications* [online]. England: Nature Publishing Group, 15(1), 735-735 [cit. 2024-02-25]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-024-44902-2.

CHENG, Cheng-chung, Fang-han YU, Pi-shao KO, Hsiao-ting LIN, Wei-shiang LIN, Shu-meng CHENG a Sui-lung SU, 2021. Prognostic Analysis of Patients with Acute Myocardial Infarction Undergoing Implantation of Different Stents for the First Time. *Journal of clinical medicine* [online]. Basel: MDPI, 10(21), 5093 [cit. 2024-02-25]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: doi:10.3390/jcm10215093.

KHALILI, Fardin, Peshala P T GAMAGE, Richard H SANDLER a Hansen A MANSY, 2018. Adverse Hemodynamic Conditions Associated with Mechanical Heart Valve Leaflet Immobility. *Bioengineering (Basel)* [online]. Switzerland: MDPI, 5(3), 74 [cit. 2024-03-13]. ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering5030074.

BARK, David L., Hamed VAHABI, Hieu BUI, Sanli MOVAFAGHI, Brandon MOORE, et al., 2017. Hemodynamic Performance and Thrombogenic Properties of a Superhydrophobic Bileaflet Mechanical Heart Valve. *Annals of biomedical engineering* [online]. New York: Springer US, 45(2), 452-463 [cit. 2024-03-13]. ISSN 0090-6964. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-016-1618-2.

TSCHORN, Philip, Filip SCHRÖTER, Martin HARTRUMPF, Ralf-uwe KÜHNEL, Roya OSTOVAR a Johannes M. ALBES, 2022. Engineering a New Polymeric Heart Valve Using 3D Printing—TRISKELION. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* [online]. Basel: MDPI, 58(11), 1695 [cit. 2024-03-13]. ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/medicina58111695.

SUN, Mingze, Mohamed ELKHODIRY, Lei SHI, et al., 2022. A biomimetic multilayered polymeric material designed for heart valve repair and replacement. *Biomaterials* [online]. Netherlands: Elsevier, 288, 121756-121756 [cit. 2024-03-14]. ISSN 0142-9612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2022.121756.

OLTEAN-DAN, Daniel, Gabriela-bombonica DOGARU, Elena-mihaela JIANU, et al., 2021. Biomimetic Composite Coatings for Activation of Titanium Implant Surfaces: Methodological Approach and *In Vivo* Enhanced Osseointegration. *Micromachines (Basel)* [online]. Basel: MDPI, 12(11), 1352 [cit. 2024-02-25]. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi12111352.

LU, Shouxun, Benjamin Steven VIEN, Matthias RUSS, Mark FITZGERALD a Wing Kong CHIU, 2022. Experimental Investigation of Vibration Analysis on Implant Stability for a Novel Implant Design. *Sensors (Basel, Switzerland)* [online]. Switzerland: MDPI, 22(4), 1685 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s22041685.

GABAY, Noa, Tomer RON, Razi VAGO, Amnon SHIRIZLY a Eli AGHION, 2021. Evaluating the Prospects of Ti-Base Lattice Infiltrated with Biodegradable Zn–2%Fe Alloy as a Structural Material for Osseointegrated Implants—In Vitro Study. *Materials* [online]. Basel: MDPI, 14(16), 4682 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma14164682.

BENCA, Emir, Beatrice FERRANTE, Ewald UNGER, Andreas STRASSL, Lena HIRTNER, et al., 2023. Patient-Specific Guides for Accurate and Precise Positioning of Osseointegrated Implants in Transfemoral Amputations: A Proof-of-Concept In Vitro Study. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* [online]. Switzerland: MDPI, 59(3), 429 [cit. 2024-02-24]. ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/medicina59030429.

FIORILLO, Luca, Dario MILONE, Danilo D'ANDREA, Dario SANTONOCITO, et al., 2022. Finite Element Analysis of Zirconia Dental Implant. *Prosthesis (Basel, Switzerland)* [online]. Basel: MDPI, 4(3), 490-499 [cit. 2024-02-25]. ISSN 2673-1592. Dostupné z: doi:10.3390/prosthesis4030040.