



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Stanovení funkce trombocytů pomocí impedanční
agregometrie u trombocytárních transfuzních
přípravků**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor práce: Anna Erfányuková

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.

Kladno 2016



CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING

Department of Health Care Disciplines and Population Protection

**The determination of the function of platelet by means
of impedance aggregometry in the platelet
transfusion units**

Bachelor Thesis

Study Programme: Specialization in Health Care

Branch of study: Medical Laboratory

Author: Anna Erfányuková

Thesis advisor: Ing. Ludmila Landová, Ph.D

Kladno 2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Anna Erfányuková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Stanovení funkce trombocytů pomocí impedanční agregometrie u trombocytárních transfúzních přípravků**
Téma anglicky: The determination of the function of platelet by means of impedance aggregometry in the platelet transfusion units

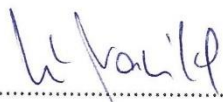
Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

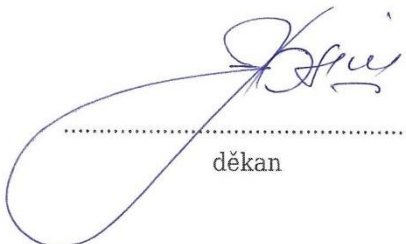
Úvod: Krevní destičky hrají klíčovou roli v procesu zástavy krvácení tvorbou primární destičkové hemostatické zátky. Vyšetření agregability těchto trombocytů na přístroji „Multiplate“, (Roche, Germany), se provádí z plné krve ve speciálních kyvetách, které mají dva páry senzorů, na kterých se destičky po indukci adherují a agregují. Během nasedání destiček na senzory dochází ke zvýšení elektrického odporu (impedance). Elektrické napětí bylo převedeno na agregační jednotky AU. Cíl BP: Stanovení referenčních rozmezí v transfúzních trombocytárních přípravcích pomocí funkce krevních destiček. Dílčím cílem je porovnání zamražených trombocytárních přípravků a čerstvých trombocytárních přípravků pomocí analyzátoru Multiplate (Roche, Germany) pomocí TRAP ev.dalších testů.

Seznam odborné literatury:

- [1] Paniccia et al 2009, Assessment of Platelet Function on Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry in High-Risk Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapy, Am J Clin Pathol., [Revidováno Dostupné z DOI: 10.1309/AJCPT3K1SGAPOIZ], číslo 131:834-842, ISSN 1943-7722
[2] Pedersen BS.B. et al.: 2009, Evaluation of aspirin response by Multiplate whole blood aggregometry and light transmission aggregometry. Platelets., Sep;20 , ed. (6):415-20. , [Revidováno 10.1080/09537100903100643], ISSN 0953-7104
[3] Pecka, M., Přehled laboratorní hematologie. Díl I-IV, Praha, Galén, 1995 - 2000, ISBN 80-85824-28-0, 80-85824-43-4, 80-85824-89-2

zadání platné do: 30.09.2017
Vedoucí: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 18.12.2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Stanovení funkce trombocytů pomocí impedanční agregometrie u trombocytárních transfuzních přípravků“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 20. května 2016

.....

Anna Erfányuková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Ludmile Landové, Ph.D., své vedoucí práce, za odborné vedení této práce, její věcné připomínky, cenné rady, ale také trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce věnovala.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením funkce krevních destiček pomocí metody impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate® (Roche, Germany) u trombocytárních transfuzních přípravků. V teoretické části jsou popsány obecné vlastnosti a charakteristika krevních destiček, včetně jejich funkce při zástavě krvácení – koagulace. Dále jsou zde uvedeny příklady destičkových induktorů a inhibitorů, tedy látek, které ovlivňují agregaci krevních destiček. Praktická část se zabývá porovnáním výsledků impedanční agregometrie u vzorků z plné krve dárců a u trombocytárních transfuzních přípravků.

Klíčová slova:

krevní destičky (trombocyty), agregace, impedanční agregometrie, TRAPtest

Abstract

The Bachelor's thesis aims to identify the function of platelets in thrombocyte transfusion products by impedance aggregometry using the Multiplate® analyser (Roche, Germany). The theoretical part of the thesis describes general properties and characteristics of platelets including their role in stopping bleeding - coagulation. It also provides examples of platelet inducers and inhibitors, which are substances influencing platelet aggregation. The practical part of the thesis compares the results of impedance aggregometry of donor whole blood samples and thrombocyte transfusion products.

Key words:

platelets (trombocytes), aggregaion, impedance aggregometry, TRAPtest

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Teoretické základy práce	2
2. 1 Přehled současného stavu	2
2. 2 Krev	2
2. 2. 1 Složení krve	2
2. 2. 2 Hemopoéza	4
2. 2. 2. 1 Lokalizace hemopoézy	4
2. 2. 3 Hemostáza.....	5
2. 2. 4 Cévní stěna.....	6
2. 3 Krevní destičky	7
2. 3. 1 Vznik a vývoj krevních destiček.....	7
2. 3. 1. 1 Vývoj krevních buněk.....	7
2. 3. 1. 2 Vývoj krevních destiček	8
2. 3. 2 Struktura krevních destiček	9
2. 3. 3 Metabolismus krevních destiček.....	13
2. 3. 4 Funkce krevních destiček.....	13
2. 3. 4. 1 Adheze	13
2. 4 Induktory agregace krevních destiček	16
2. 4. 1 Adenosindifosfát.....	16
2. 4. 2 Tromboxan A ₂	17
2. 4. 3 Kolagen.....	17
2. 4. 4 Faktor aktivující destičky.....	17
2. 4. 5 Adrenalin	17
2. 4. 6 Trombin	18
2. 4. 7 Kyselina arachidonová.....	18
2. 4. 8 Ristocetin	18

2. 5 Protidestičková léčba	19
2. 5. 1 Kyselina acetylsalicylová	19
2. 5. 2 Thienopyridiny.....	19
2. 5. 3 Inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa	20
3 Cíl bakalářské práce.....	21
4 Metodika práce	22
4.1 Definice souboru.....	22
4. 2 Použitý materiál	22
4. 2. 1 Diagnostika	22
4. 2. 2 Biologický materiál.....	22
4. 2. 3 Spotřební materiál.....	22
4. 3 Přístroj.....	22
Multiplate [®] analyzer (MEA – Multiplate Electrode Aggregometry)	23
4. 3. 1 Princip měření.....	24
4. 4 Postup stanovení	25
4. 4. 1 Odběr a příprava trombocytů.....	25
4. 4. 1. 1 Kryokonzervace trombocytů.....	25
4. 4. 1. 2 Rekonstituce kryokonzervovaných trombocytů	26
4. 4. 2 Příprava vzorku pro měření agregace destiček na Multiplate [®]	27
4. 4. 2. 1 Vyšetření z plné krve	27
4. 4. 2. 1 Vyšetření z čerstvých trombocytů z aferézy deleukotizovaných (TAD). 28	
4. 4. 2. 2 Vyšetření z kryokonzervovaných trombocytů (TADK)	28
4. 4. 3 Měření agregace destiček na analyzátoru Multiplate [®]	28
4. 4. 3. 1 Měření agregace destiček z plné krve.....	28
4. 4. 3. 2 Měření agregace destiček z TAD nebo TADK.....	29
4. 4. 3 Kontrola funkce TADK měřením monoklonálních protilátek pomocí průtokové cytometrie.	30

5 Výsledky	32
5. 1 Vyhodnocení výsledků měření agregace destiček u kryotrombocytů	32
5. 2 Stanovení referenčních rozmezí.....	34
5. 2. 1 Stanovení referenčních rozmezí u trombocytárních přípravků.....	34
5. 2. 2 Stanovení referenčních rozmezí u trombocytů v plné krvi.....	37
5. 3 Statistické porovnání hodnot měření agregace destiček u trombocytárních přípravků a trombocytů z plné krve	39
6 Diskuze	40
7 Závěr	46
8 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	47
9 Seznam použité literatury	49
9.1 Internetové zdroje	56
10 Seznam obrázků.....	57
11 Seznam grafů	58
12 Seznam tabulek.....	59
13 Přílohy.....	60
13. 1 Naměřené hodnoty dárců	60

1 Úvod

Bakalářská práce pojednává o fungování krevních destiček, které jsou nezbytné při procesu krevního srážení. Jsou zde popsány obecné vlastnosti a charakteristika krevních destiček, způsob fungování a jejich význam při zástavě krvácení. Dále se bakalářská práce zaměřuje zejména na monitorování a stanovení agregace destiček pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate. Jsou zde porovnány výsledky agregace trombocytů z plné krve a z transfuzních trombocytárních přípravků.

Analyzátor Multiplate® se primárně využívá ke stanovení funkce trombocytů v plné krvi. V ÚVN –VFN v Praze je testování kryokonzervovaných, ale i aferetických čerstvých transfuzních trombocytárních přípravků touto metodou ve výzkumné fázi. Z tohoto důvodu je tato bakalářská práce zaměřena na porovnání agregace krevních destiček pomocí analyzátoru Multiplate® u vzorků plné krve a u čerstvých trombocytárních přípravků z aferézy. Metoda stanovení impedance u kryokonzervovaných rozmrazených trombocytárních přípravků se dále vyvíjí.

Motivací k řešení této problematiky byla především velice pozitivní předchozí zkušenost s Oddělením hematologie a krevní transfuze ÚVN, kde jsem po dobu svého studia vykonávala odbornou praxi.

2 Teoretické základy práce

2.1 Přehled současného stavu

Krevní destičky jsou nezbytné složky procesu srážení krve a hrají tak klíčovou roli při zástavě krvácení. V dnešní době představují poruchy srážení krve zvýšené riziko vzniku trombózy. Mimo vrozených příčin přispívají ke vzniku trombofilních stavů také rizikové faktory, a to zejména způsob života dnešní populace jako je kouření, obezita a nedostatek pohybu. Proto je za určitých okolností potřeba potlačit nebo zmírnit funkci destiček, čehož se využívá při protideštičkové léčbě. Druhým pilířem hemostatických poruch jsou krvácivé stavy, které mohou být zapříčiněny nedostatečným počtem nebo poruchami funkce trombocytů. V obou případech poruch srážení krve je nezbytný monitoring a vyšetření funkce trombocytů, které lze snadno analyzovat například využitím technologie impedanční agregometrie.

2.2 Krev

Krev je vysoce specializovaná tělesná tekutina člověka a vyšších živočichů, která proudí v uzavřené cévní soustavě a jejíž hlavní funkcí je zajištění nepřetržité výměny látek mezi tkáněmi. Transportní funkce krve zajišťuje tkáním přívod živin a kyslíku, umožňuje přenos specifických látek, jako jsou hormony, vitaminy a minerály a naopak z tkání odvádí oxid uhličitý a odpadní metabolity. Díky snaze o udržení stálého pH a tělesné teploty se krev podílí na udržování stálosti vnitřního prostředí. Důležitou roli hraje také v procesu mechanické obrany organismu. (Pecka, 2002, s. 58-59)

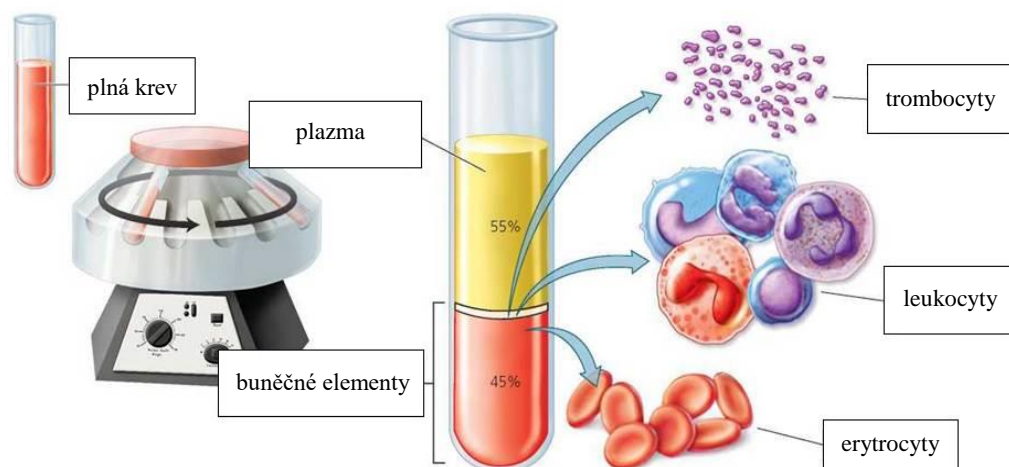
2.2.1 Složení krve

Dospělý člověk má průměrně asi 5 litrů krve, což odpovídá přibližně 7-8% tělesné hmotnosti. Krev je složena ze dvou základních složek, tekuté a buněčné. (Pecka, 2002, s. 58-64)

Tekutou složkou krve je plazma, která představuje asi 55% z celkového objemu krve. Je to extracelulární průhledná tekutina slabě žlutého zabarvení, kterou lze získat z nestrážlivé krve. Za patologických podmínek může být lehce zakalená, se silně žlutým nebo červeným zabarvením. Svým složením se jedná v podstatě o slabě zásaditý vodný roztok elektrolytů, bílkovin a malých organických molekul. Ionty sodíku a draslíku

udržují rovnovážný stav mezi intra a extracelulární tekutinou. Vápník a hořčík se podílejí na srážení krve, při obranných reakcích a jsou důležité pro správnou funkci nervů a kosterní svaloviny. Železnaté, měďnaté a kobaltnaté ionty mají svůj význam při krvetvorbě a enzymatických reakcích. Organické látky tvoří zejména bílkoviny (albuminy, globuliny, fibrinogen a glykoproteiny), dále pak sacharidy, lipidy, močovina, vitaminy a hormony. (Pecka, 2002, s. 58-64)

Pevnou složkou krve jsou buněčné elementy rozptýlené v krevní plazmě, které odpovídají asi 45% z celkového objemu krve. Červené krvinky (erythrocyty) jsou bezjaderné buňky bikonkávního tvaru vyplněné hemoglobinem. Hlavní funkcí erythrocytů je přenos dýchacích plynů využitím vlastnosti hemoglobinu vázat na sebe kyslík a oxid uhličitý. Bílé krvinky (leukocyty) zajišťují obranyschopnost organismu a dále se účastní různých metabolických pochodů. Krevní destičky (trombocyty) jsou bezjaderné buňky, které se podílejí při zástavě krvácení (hemostáze) a regeneraci cév. (Pecka, 2002, s. 58 -64)



Obr. 1 Složení krve po centrifugaci (upraveno dle URL1)

2. 2. 2 Hemopoéza

Hemopoéza neboli krvetvorba představuje proces tvorby krevních buněčných komponent v krvetvorných orgánech. Formované krevní elementy (erytrocyty, leukocyty, trombocyty), které tvoří pevnou složku krve, se od sebe liší mimo jiné svou životností. (Trojan, 2003, s. 117)

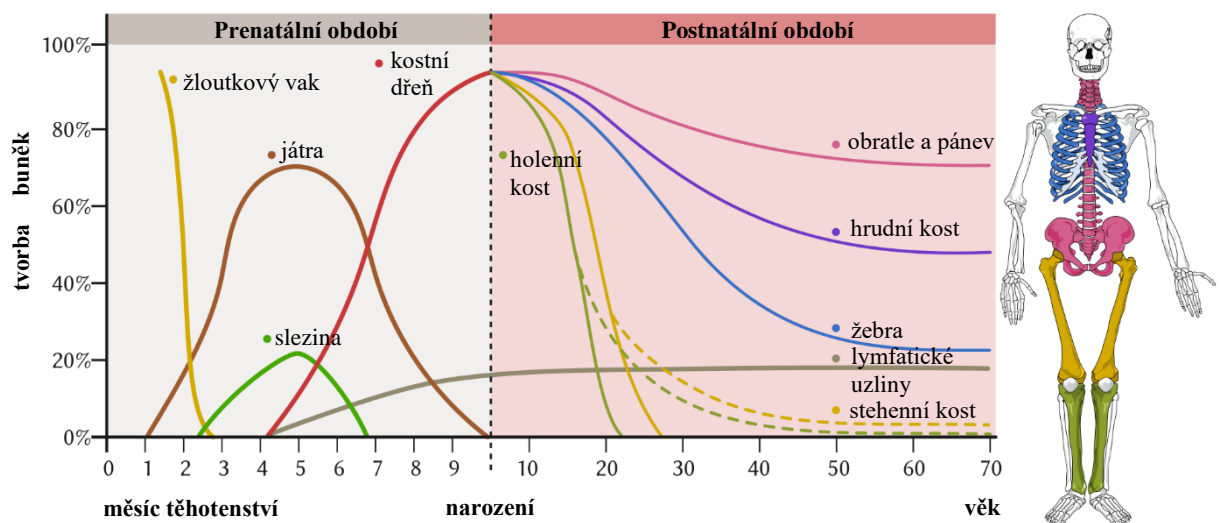
Životní cyklus krevní buňky se pohybuje v rozmezí od několika hodin až po dobu týdnů či měsíců. Mají-li být v krvi udržovány fyziologické hodnoty, musí být produkce krevních buněk v rovnováze s jejich zánikem. Aby tato rovnováha mohla fungovat během celého života, je zapotřebí existence buněčné populace, která je schopna produkovat stále nové krevní buňky. Takovou populací, od které jsou odvozeny všechny formované krevní elementy, jsou pluripotentní kmenové buňky. (Trojan, 2003, s. 117)

2. 2. 2. 1 Lokalizace hemopoézy

Během prenatalního období je hemopoéza lokalizována nejprve ve žloutkovém vaku, následně proces krvetvorby probíhá od 6. týdne vývoje i v játrech, od 12. týdne v slezině a od 20. týdne vývoje se krvetvorba přesouvá do kostní dřeně, která představuje hlavní hemopoetický orgán. (Penka, 2011, s. 15)

Proces prenatalní hemopoézy se skládá ze tří plynule navazujících period, které se částečně překrývají. Mezoblastová perioda probíhá v oblasti žloutkového vaku, kde dochází k tvorbě krevních ostrůvků primitivních buněk, lemovaných endoteliálními buňkami. Vytváří se tak primitivní cévy, které se následně propojí s cévním systémem embrya. Hemopoéza ve žloutkovém vaku vede ke vzniku primitivních erytrocytů. Během mezoblastového období dochází také k začátku krvetvorby v mezenchymu mezi hepatocyty, která postupně převládne nad krvetvorbou ve žloutkovém vaku. Při hepatolíněární periodě jsou játra hlavním zdrojem hematopoézy až do poloviny embryonálního vývoje. V menší míře se od 12. týdne podílí i slezina. Kromě normoblastů, které vyžívají v erytrocyty, se v malém množství tvoří i prekurzory trombocytů a lymfocytů. Samotné jaterní období trvá až do porodu. V druhé polovině prenatalního vývoje se krvinky začínají tvořit v kostní dřeni. Toto období se nazývá medulární, neboli dřeňové a vznikají během něj všechny typy krvinek, včetně granulocytů. (Penka, 2011, s. 15)

Kostní dřeň zůstává primárním krvetvorným orgánem i v postnatální fázi, tedy po narození. Přibližně do čtvrtého roku života je zastoupena ve většině kostí a s přibývajícím věkem se pomalu přeměňuje na inaktivní tukovou kostní dřeň. V dospělosti se nachází pouze na několika málo místech těla, jako je hrudní kost, kyčelní kosti, proximální části dlouhých kostí, lebka, obratle a žebra. Odtud jsou jednotlivé krvinky uvolňovány do krve. Přechod krvinek z kostní dřeně je uskutečněn pomocí různých mechanismů. Leukocyty prochází stěnou aktivním pohybem, tzv. diapedézou pomocí výběžků cytoplazmy (pseudopodií). Erytrocyty využívají pro přestup svou pružnost, díky níž dochází k jejich deformaci a erytrocyty jsou tak schopné prostoupit mezi buňkami do nitra cévy, kde opět získávají původní tvar. Krevní destičky jsou v nitru cév uvolňovány tokem krve z cytoplazmy megakaryocytů, které prostupují mezi endotelovými buňkami. (Pecka, 2002, s. 70-75)



Obr. 4 Procentuální zastoupení krvetvorných orgánů v prenatalním a postnatalním období (upraveno dle URL2)

2. 2. 3 Hemostáza

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení. Jedná se o velmi komplikovaný a přesně regulovaný proces, na kterém se podílí celá řada složek a mechanismů s rozdílnými vstupy a účinky. Mechanismus hemostázy dokáže zastavit krvácení pouze v místě poranění a současně udržuje tekutost krve v neporušeném cévním řečišti. Základní složky hemostázy tvoří cévní stěna, krevní destičky a systém plazmatických proteinů. Svoji úlohu v ní však mají i ostatní složky krve a cévní stěny

a to zejména červené krvinky, bílé krvinky, lipidy, bílkoviny a minerály. (Pecka, 2004, s. 26) (Penka, 2011, s. 31)

V případě porušení endotelu dojde postupně k vytvoření krevní sraženiny, která zamezuje dalším ztrátám krve. Proces zahrnuje několik fází, během nichž dochází ke vzniku destičkového agregátu, zpevňující fibrinové sítě a současně k aktivaci děje, který takto vytvořenou sraženinu rozpustí. (Matýšková, 1999, s. 7-9)

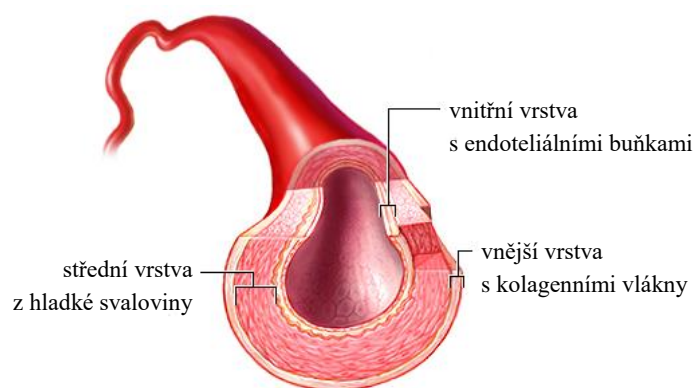
Celý proces krevního srážení je velmi přísně regulován a kontrolován řadou mechanismů, které brání nekontrolovanému srážení nebo krvácení. V některých případech dochází k aktivaci krevního srážení i v neporušených cévách. Krev se sráží uvnitř cév a dochází ke vzniku trombu (nástěnné sraženiny), který omezí průtok krve cévou, což může vést k velmi závažným komplikacím. (Indrák, 2006, s. 93)

2. 2. 4 Cévní stěna

Cévní systém má vedle své funkce cirkulační, zajišťující rozvod okysličené krve a následný sběr, také obrovský význam pro hemostázu, při které se uplatňuje cévní stěna, zejména její vnitřní vrstva, tzv. endotel.

Strukturu cévní stěny tvoří tři vrstvy – vnitřní tunica intima, střední tunica media a vnější tunica adventitia. Tunica intima se skládá z jedné vrstvy plochých endoteliálních buněk uložených na bazální membráně. Tunica media je nejsilnější vrstva stěny cévy, tvořena hladkou svalovinou a sítí kolagenních a elastických vláken. Tunica adventitia představuje povrch cévy z fibrilárního vaziva s kolagenními i elastickými vlákny, která se různě překřičují a vytvářejí síť. (Čihák, 2016)

Endoteliální buňky na povrchu vnitřní stěny cév tvoří aktivní povrch mezi cirkulující krví a tkáněmi a hrají klíčovou roli v procesu hemostázy. Endotel kontroluje protrombotické děje při poškození cév, udržuje fluiditu krve za fyziologických podmínek a zároveň slouží jako místo syntézy a uložení celé řady látek, které se na hemostáze podílejí. Během procesu srážení krve je cévní stěna schopná vazokonstrikce, neboli stažení, které zpomalí průtok krve daným místem. Následná vazodilatace, neboli rozšíření cévy, usnadňuje rychlé odplavení hemostatických látek podílejících se na hemostáze a je důležitá pro udržení srážení pouze v místě poškození cévy. Vazokonstrikce a vazodilatace představují v procesu krevního srážení mechanickou úlohou endotelu. (Matýšková, 1999, s. 9-11)



Obr. 6 Struktura cévní stěny (upraveno dle URL3)

2. 3 Krevní destičky

Krevní destičky jsou nejmenší formované krevní elementy v krevním řečišti o velikosti 2-4 μm , jejichž hlavní fyziologickou funkcí je zástava krvácení. Vznikají přeměnou z megakaryocytů v kostní dřeni a za fyziologických podmínek je jich v periferní krvi obsaženo asi 150.000 až 300.000 na μl krve. Za den se v kostní dřeni obnoví asi 20% z jejich celkového počtu. V periferní krvi cirkulují destičky okolo 7 dní, kdy přibližně dvě třetiny z celkového počtu destiček cirkulují a jedna třetina destiček je jako zásoba uložena ve slezině, přičemž se navzájem vyměňují. Staré a degenerované destičky jsou fagocytovány v játrech a slezině v tzv. retikuloendoteliálním systému. (Gawaz, 2001, s. 4)

Na rozdíl od leukocytů a ostatních eukaryotních buněk nemají destičky buněčné jádro, a proto nejsou schopné, nebo jen v omezené míře, syntetizovat proteiny *de novo*. Z tohoto důvodu nejsou destičky považovány za buňky v pravém smyslu a označují se proto jako bezjaderné buňky. (Gawaz, 2001, s. 4)

2. 3. 1 Vznik a vývoj krevních destiček

2. 3. 1. 1 Vývoj krevních buněk

Krevní buňky se vyvíjí v kostní dřeni od stádia kmenové buňky přes buňky progenitorové a postupně se diferencují do finální podoby krevních elementů – erytrocytu, leukocyту a trombocyту. (Pecka, 2002, s. 80)

Výchozí buňkou všech krvinek je buňka mezenchymu, která se postupně přeměňuje v retikulární buňku a dále v hemocystoblast, který se stává v zárodečném období kmenovou buňkou. Všechny krvinky obsažené v krevním oběhu mají jedinou

společnou hemopoetickou, tzv. pluripotentní kmenovou buňku, která je schopná neomezené sebeobnovy. Část buněk po dělení zůstává ve stádiu pluripotentní kmenové buňky a část se dále vyvíjí a diferencuje v progenitorovou kmenovou buňku. Progenitorová kmenová buňka ztrácí schopnost sebeobnovy a slouží jako předloha pro více, či jeden buněčný typ. (Pecka, 2002, s. 81-82)

Jednotlivé krevní buňky se dají rozdělit do různých linií, které mají společnou progenitorovou buňku CFU. Pro buňky myelopoézy, tedy erytrocyty, makrofágy a megakaryocyty je společná progenitorová buňka CFU-GEMM. Lymfoidní řada, kam řadíme T-lymfocyty a B-lymfocyty, má vlastní progenitorovou buňku, tzv. lymfoidní progenitor. (Pecka, 2002, s. 83-84)

2. 3. 1. 2 Vývoj krevních destiček

Krevní destičky vznikají a uvolňují se do krevního řečiště z cytoplazmy prekurzorových buněk v kostní dřeni, tzv. megakaryocytů. (Patel, 2005, s. 3348)

Megakaryocyty jsou největší (50 - 100 μm), vzácně se vyskytující buňky kostní dřene. Představují asi 0,01% z jaderných buněk kostní dřene. Obsahují velké množství laločnatých jader, které se dělí bez dělení samotných buněk. (Machlus, 2013, s. 785)

Megakaryocyty vznikají z pluripotentní kmenové buňky působením mnoha faktorů. Transkripční faktor GATA-1 reguluje proces diferenciace, faktor NF-E2 je zodpovědný za regulaci formace výběžků megakaryocytů. (CHANG, 2007, s. 318) Humorální růstový faktor trombopoetin (TPO) slouží jako primární signál pro tvorbu megakaryocytů, účinný je také GM-CSF, nepřímo působící G-CSF, či růstový faktor fibroblastů FGF. Mezi cytokiny, které se podílejí na zrání megakaryocytů patří IL-3, IL- 6 a IL-11. (Patel, 2005, s. 3348)

První morfologicky rozlišitelnou buňkou megakaryocytární linie je megakaryoplast, někdy označovaný jako nezralý megakaryocyt I. Během vyžívání megakaryoplastu dochází ke zdvojování počtu chromosomů, zatímco samotná buňka se nedělí. Tento proces se označuje jako endomitóza. Současně také dochází ke zrání cytoplazmy, která se stává objemnější, zvětšuje se zde počet granulí, tvoří se membránové glkoproteiny a dochází k výrazné produkci cytoplazmatické membrány. Dalším zráním pak dojde k vytvoření promegakaryocytu, který se následně diferencuje ve vyžralý megakaryocyt. (Lexová, 2000, s. 20) (Pecka, 2002, s. 152)

Ze zralého megakaryocyty se může vytvořit až několik tisíc krevních destiček. Konkrétně dochází k prodlužování a větvení dlouhých výběžků megakaryocytů, označovaných jako pseudopodia, které se opakovaně štěpí na menší části za vzniku prodestiček. Přeměna celé megakaryocytární cytoplazmy do prodestiček je regulována cytoskeletárními proteiny. Aktomyosinový systém je zodpovědný za větvení a formování prodestiček, zatímco polymerizace tubulinu v mikrotubulech megakaryocytů je nezbytná pro prodlužování prodestiček a zároveň umožňuje transport organel a granulí k jednotlivým koncům a vytvoření plně funkčních destiček. (Malara, 2012, s. 241)

2. 3. 2 Struktura krevních destiček

Za normálních podmínek jsou krevní destičky diskoidní tělíska, jejichž tvar se při stimulaci destiček může snadno měnit. Podle funkce lze strukturu destiček rozdělit na čtyři základní oblasti: periferní zónu, strukturní zónu, zónu organel a membránové systémy. (Gawaz, 2001, s. 4)

Periferní zóna vytváří fyzikální bariéru, která odděluje cytoplazmatické orgány destiček od okolního prostředí. Vzniká tak spojení mezi povrchem a vnitřkem, tzv. otevřený kanálkový systém. Tato oblast je zdrojem různých receptorových míst, tvoří se zde transdukční systém pro stimuly, které spouští důležité interakce destiček, jako jsou adheze, agregace a sekrece. Periferní zóna také odpovídá za imunologickou specifičnost a je zdrojem fosfolipidů pro hemokoagulaci. (Nosál, 1990, s. 23)

Cytoplazmatická membrána destiček se skládá ze tří hlavních částí: glykokalyx, vlastní destičkové membrány a submembránové oblasti. Na povrchu buňky se nachází glykokalyx, který představuje zevní hrubou vrstvu destičkové membrány. Je složen z glykoproteinů a částečně glykolipidů. Glykoproteiny zastávají funkci receptorů membrány, které umožňují přenos signálů do buňky, zejména stimuly pro agregaci či adhezi. (Nosál, 1990, s. 23-24)

Střední vrstvu periferní zóny představuje vlastní destičková membrána, která se svým složením a charakterem podobá membránám ostatních buněk. Skládá se z dvojvrstvy lipidů bohaté na fosfolipidy, které tvoří vrstvu nezbytnou pro interakci s koagulačními proteiny. (Gresele, 2002, s. 41) V největším množství je zastoupený fosfatidylcholin, který je společně se sfingomyelin orientován vně membrány. Na vnitřní straně převládá fosfatidylserin, fosfatidyletanolamin a fosfatidylinozitol. Toto asymetrické uspořádání má význam pro správné fungování destiček. Zbytek lipidů

v membráně tvoří především cholesterol, který je společně s fosfolipidy zodpovědný za tekutost destičkové membrány, která se mění s věkem destičky. (Nosál, 1990, s. 25-26)

Další složky destičkové membrány tvoří proteiny, které představují důležitý enzymatický aparát. (Nosál, 1990, s. 26) Společně s proteiny obsahuje membrána také iontové pumpy, především pro sodík a draslík, nezbytné pro udržení transmembránového iontového gradientu. (Bhatt, 2008, s. 2)

Submembránová oblast se nachází pod vrstvou vlastní membrány destiček. Obsahuje síť mikrofilament, která je vzájemně propojena s glykoproteiny a filamenti v cytoplasmě buňky a společně se podílejí na udržování tvaru destiček. (Bhatt, 2008, s. 2)

Strukturní zóna představuje matrix cytoplasmy destiček a je označována také jako cytoskeleton. Skládá se z dvou vláknitých systémů v různém stavu polymerizace, které udržují diskoidní tvar destiček a zajišťují jeho změnu, vnitřní kontrakci a sekreci granul. Strukturní zóna je složena z mikrotubulů a mikrofilament, kdy obě složky jsou složeny z jednoho či více proteinů. Hlavní proteinovou složkou mikrotubulů je tubulin, který je polymerizovaný do tvaru trubiček. Mikrofilamenta jsou tvořeny komplexem proteinů aktinu a myozinu, jež představují základní hybnou jednotku mikrofilament. (Pecka, 2006, s. 22)

Další oblastí je zóna organel, nacházející se v cytoplasmě destičky. Tvoří ji především mitochondrie, glykogen, lysozomy, α -granule, denzní granule a ojedinele také peroxisomy. Probíhají zde různé metabolické procesy buňky a ukládání některých látek. V neaktivované destičce jsou organely volně rozptýlené v cytoplasmě. Aktivací destičky dochází k jejich shlukování. Organely se podílejí na regulaci řady pochodů v organismu, např. hemostázy nebo regulace tonusu hladké svaloviny cév. (Nosál, 1990, s. 29-30)

Denzní tělíska tvoří asi 1% z celkového počtu destiček, což odpovídá asi 6-8 denzních granulí na jednu destičku. Lze je velmi dobře pozorovat v elektronovém mikroskopu, díky jejich vysoké hustotě. Svým složením jsou charakteristické především díky vysoké koncentraci serotoninu, ale také vápenatých iontů, ATP či ADP. Toto specifické složení denzních granulí má význam pro správný průběh procesu agregace. (Nosál, 1990, s. 30-31)

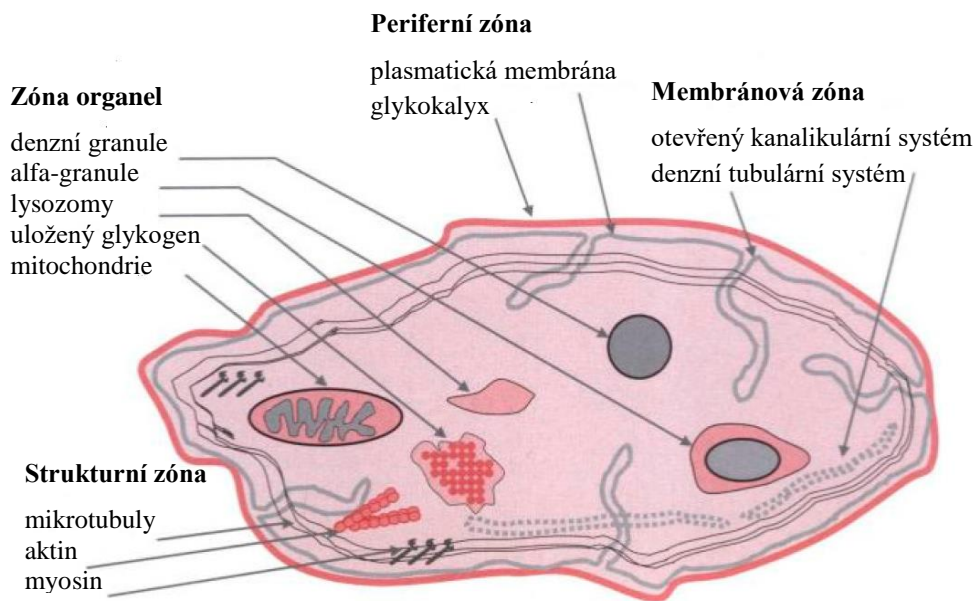
α -granule jsou nejpočetněji zastoupené granule krevních destiček. Oproti denzním granulím jsou větší a jsou ohraničené membránou, která se podobně jako membrána destiček skládá z fosfolipidů, obsahuje však větší množství cholesterolu a proteinů. Proteiny α -granulí hrají důležitou roli v řadě biologických funkcí, jako jsou adheze, agregace, chemotaxe, proliferace a koagulace. (Gawaz, 2001, s. 6)

Lysozomy představují třetí typ destičkových granulí. Obsahují řadu enzymů, zejména hydrolytické enzymy, jako např. β -glukuronidázu a kyselou fosfatázu. Enzymy lysozymů se vylučují po aktivaci krevní destičky trombinem nebo kolagenem. (Pecka, 2006, s. 23)

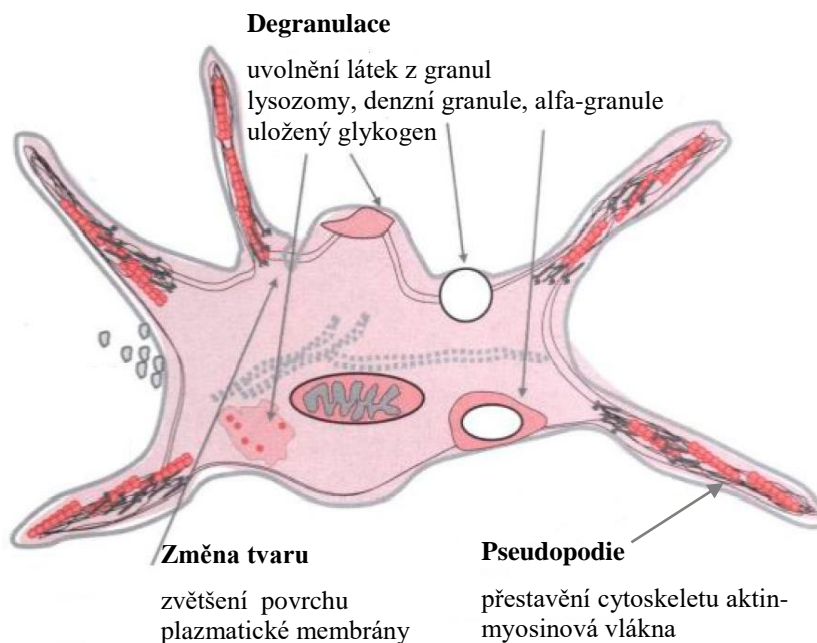
Mitochondrie krevních destiček zaujímají asi 3% z celkového objemu, přičemž jejich počet souvisí s věkem destičky. Slouží jako energetický zdroj pro buňku, kdy energii získávají oxidativní fosforylací. Mitochondrie destiček obsahují vápenaté ionty, některé důležité enzymy a probíhá zde syntéza řady proteinů. (Pecka, 2006, s. 24)

Další morfológickou oblastí, která vytváří strukturu destiček, jsou membránové systémy. Otevřený kanálkový systém (OKS) představuje složitou síť kanálků, vzniklých vchlípením plazmatické membrány, která prochází různě hluboko do cytoplasmy. Kanálky jsou mezi sebou vzájemně propojené a současně se pojí také s denzním tubulárním systémem. OKS plní v destičce několik funkcí. Výrazně zvětšují povrch destiček, umožňují a urychlují transport látek z vnějšího prostředí do buňky a současně slouží k vyplavení mediátorů z granulí na povrch buňky. OKS vytváří na povrchu destiček nálevkovité otvory, díky kterým destička získává houbovitý vzhled. (Nosál, 1990, s. 33)

Denzní tubulární systém (DTS) je odvozený od endoplazmatického retikula megakaryocyty, což dokazuje přítomnost peroxidázy a glukózo-6-fosfát dehydrogenázy. (Matýšková, 1999, s. 19) DTS vytváří souvislou síť úzkých kanálků, které slouží jako hlavní zásobník vápenatých iontů a probíhá zde metabolismus prostaglandinů. (Kubisz, 1987, s. 22-23) Systém kanálků DTS je nepravidelně rozložen v intracelulárním prostředí destičky. Často se dostává do kontaktu s OKS a společně s ostatními destičkovými zónami vykonávají důležité metabolické a transportní funkce. (Nosál, 1990, s. 33-34)



Obr. 8 Schématický nákres krevní destičky v klidovém stavu (upraveno dle Gawaz, 2001, s. 5)



Obr. 11 Schématický nákres krevní destičky v aktivovaném stavu (upraveno dle Gawaz, 2001, s. 5)

2. 3. 3 Metabolismus krevních destiček

V krevních destičkách probíhá řada buněčných reakcí, které jsou velmi energeticky náročné. Zdrojem energie pro krevní destičky je převážně glykogen, jehož štěpné produkty jsou dále oxidovány v mitochondriích za vzniku ATP, která se z většiny ukládá v zásobním poolu destičky a v menší míře v poolu metabolickém. Metabolický pool je lokalizován v cytoplazmě, mitochondriích a membráně destiček, zatímco zásobní pool je lokalizován v denzních granulích. Velké množství energie je potřebné pro viskózní metamorfózu a retrakci. Krevní destičky nemají schopnost buněčného dělení a syntézy DNA vzhledem k absenci jádra. (Pecka, 2006, s. 130)

2. 3. 4 Funkce krevních destiček

Krevní destičky figurují v řadě procesů, jako je spouštění zánětlivé reakce, boj proti mikrobiální infekci, metastázování nádorů, či při oddělení krevního a lymfatického systému v prenatálním období. Přesto k jejich základním funkcím patří adheze, aktivace, sekrece a agregace. (Vanhoorelbeke, 2012, s. 245)

2. 3. 4. 1 Adheze

Adhezivní interakce zprostředkované specifickými membránovými receptory podporují počáteční upevnění jednotlivých destiček na endoteliální buňky nebo subendoteliální matrix cévní stěny a tkání, která obsahuje několik adhezivních proteinů jako je kolagen, von Willebrandův faktor (vWF), laminin, fibronectin a trombospondin. (Ruggeri, 2009, s. 58) (Vanhoorelbeke, 2012, s. 245-246)

Při poškození cévní stěny dochází k porušení endotelové výstelky a k adhezi destiček k obnaženým subendotelovým strukturám. Za primární adhezi destiček na cévní povrch zodpovídá vWF s navázaným kolagenem, jež interaguje s receptorem GPIb-V-IX komplexu na membráně destiček. Vazba mezi vWF a GPIb je zvláště důležitá v podmínkách, kde je smyková rychlost vyšší než 500 až 800 ms⁻¹. (Nuyttens, 2011, s. 26) Interakce GPIb-kolagen vyvolává podněty vedoucí k buněčné aktivaci a následné syntéze a uvolňování destičkových agonistů, především tromboxanu A₂ (TxA₂) a adenosindifosfátu (ADP). Tyto agonisté společně s trombinem dále přispívají k aktivaci krevních destiček prostřednictvím proteinových G-receptorů. Pro stabilní adhezi destiček k extracelulární matrix jsou nezbytné látky zvané integriny, které se vážou na kolagen ($\alpha 2\beta 1$), fibronectin ($\alpha 5\beta 1$), laminin ($\alpha 6\beta 1$) a také na

vWF receptor, kam se váže hlavní destičkový integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Všechny tyto signální dráhy společně vyvolávají komplexní buněčné reakce, jako je aktivace integrit, uvolnění obsahu granulí a koagulační aktivita. (Nieswandt, 2011, s. 92, 95-96)

2. 3. 4. 2 Aktivace

Současně s adhezí destiček na subendotel probíhá také aktivace krevních destiček, která je vyvolána řadou mechanických či chemických impulsů, jako jsou trombin, tromboxan A_2 , ADP, kolagen nebo kyselina arachidonová, jež se vážou na specifické receptory. Trombin patří mezi jeden z nejúčinnějších aktivátorů, který vzniká na povrchu krevních destiček po vystavení tkáňového faktoru plasmatickým koagulačním faktorům. (Jobling, 2013, s. 52)

Agonisté destiček se váží na povrchové receptory glykoproteinů a stimulují transdukce signálů přes membránu pomocí specifických proteinů, které aktivují jednu z intracelulárních drah. Aktivací fosfolipázy C se zahajuje metabolismus fosfoinositidů, což vede postupně až ke stimulaci mobilizace Ca^{2+} iontů z densního tubulárního systému. Vysoká koncentrace Ca^{2+} aktivuje fosfolipázu A_2 a uvolní se kyselina arachidonová z membrány fosfolipidů. Zároveň vlivem nadbytku Ca^{2+} dojde k inhibici tvorby antiagregačně působícího cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu) a aktivaci proteinkinázy (např. myozinkinázy). (Gawaz, 2001, s. 13-15) (Pecka, 2006, s. 106-109)

Při aktivaci destičky dochází k velmi rychlé změně tvaru destičky, z diskoidního tvaru na kulovitý s výběžky (pseudopodie), což způsobí zvětšení plochy destiček. Aktivací destičky se také mění uspořádání fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány, kdy dochází k tzv. flip-flop fenoménu, během kterého se fosfolipidy z vnitřní části přetočí do vnější části membrány a naopak, čímž dojde k zápornému nabití cytoplazmatické membrány a následnému urychlení interakce koagulačních faktorů. (Pecka, 2006, s. 106-108)

2. 3. 4. 3 Sekrece

Po aktivaci destiček dochází k sekreci cytoplazmatického obsahu a látek ze zásobních granulí. Ty se během aktivace přesouvají do středu destičky, odkud jsou díky fúzi membrány OKS a perigranulární membráně vylučovány mimo membránový obvod přes síť mikrotubulů a cytoplazmatickou membránu v pseudopodiích. Z destičkových granulí se uvolňují látky jako ADP, TxA_2 , serotonin a adrenalin. Z cytoplasmy se pak uvolňují prostaglandiny a steroidní hormony. (Nosál, 1990, s. 59-62)

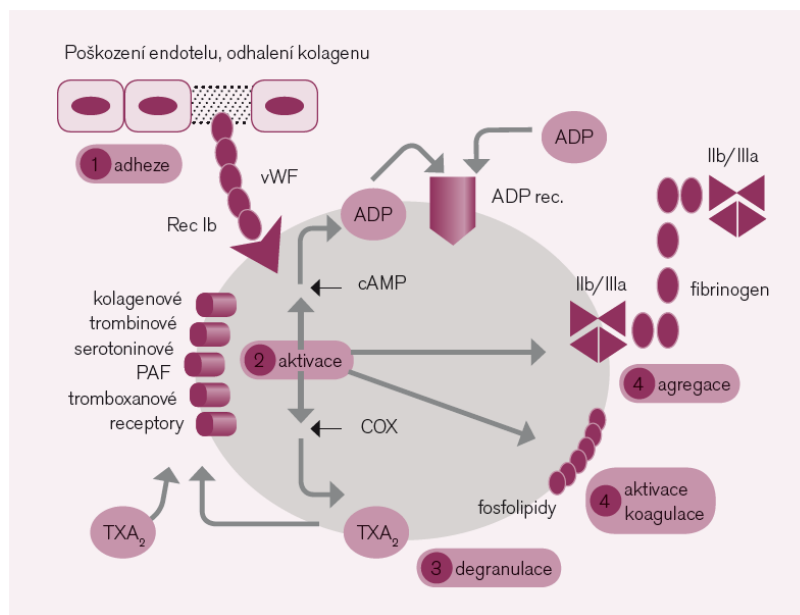
2. 3. 4. 4 Agregace

Agregace destiček je proces, při kterém se destičky vzájemně shlukují a dochází k tvorbě multideštičkového agregátu. Agregace je rozhodující proces pro tvorbu hemostatické zátky a trombózy. (Jackson, 2007, s. 5087)

Vznik destičkového agregátu je podmíněn aktivací glykoproteinových receptorů GP IIb/IIIa a následnou vazbou fibrinogenu na tyto receptory. Fibrinogen se na receptory váže epitopem arginin-glycin-kyselina asparagová (RGD), jež je na obou koncích molekuly fibrinogenu. Proto představuje ideální molekulu pro mezideštičkovou vazbu. (Malý, 2010, s. 134) (Fauknerová, 2011, s. 528) Kromě fibrinogenu obsahují RGD sekvenci i další ligandy, jako vWF, vitronektin, trombospondin a fibronektin, jež se mohou také vázat na receptor GP IIb/IIIa. (Pecka, 2006, s. 116)

Agregace destiček může probíhat ve dvou fázích. Primární agregace představuje částečné spojování destiček přes aktivované glykoproteinové oblasti GP IIb/IIIa a má vratný průběh, proto se destičky při nedostatečném impulsu oddělí. Je vyvolána ADP uvolněným z porušených tkání a po změně konformace membránových fosfolipidů dochází k pronikání Ca^{2+} do buňky. Vápník uvnitř destičky aktivuje fosfolipázu A2 a uvolní se kyselina arachidonová, jež je dále metabolizována na tromboxan A_2 . (Pecka, 2006, s. 113-118) Sekundární agregace navazuje na primární a je způsobena silným impulsem, který zpravidla vyvolá sekreci granulí. Uvolněný trombospondin stabilizuje vazbu fibrinogenu na destičky a zpevňuje mezideštičkové spoje. Průběh sekundární agregace je nevratný. (Nosál, 1990, s. 52-53) (Pecka, 2006, s. 115-118)

Aktivací dalších destiček dochází k zesílení agregačního procesu a postupně se vytvoří hemostatická zátka, tzv. bílý trombus. Vyvrcholením závěrečné fáze primární hemostázy je přetočení fosfolipidové dvojvrstvy. Uvolněné fosfolipidy stimulují koagulační procesy na povrchu destiček, které vedou k vytvoření fibrinové zátky. (Pecka, 2004, s. 36)



Obr. 14 Schéma adheze, aktivace a agregace krevních destiček (Malý, 2010, s. 135)

2. 4 Induktory agregace krevních destiček

Agregace destiček může být vyvolána působením celé řady induktorů. Mezi silné induktory patří zejména kolagen, trombin a tromboxan A₂. Za středně silné induktory jsou považovány serotonin a ADP, zatímco adrenalin se řadí mezi slabě působící. (Vojáček, 2004, s. 58)

2. 4. 1 Adenosindifosfát

Adenosindifosfát (ADP) je destičkový induktor, který se uvolňuje při poškození endoteliálních buněk a erytrocytů, nejvíce ho však vzniká sekrecí ze zásobních granúl destiček. Destičky reagují na ADP prostřednictvím membránových receptorů P2. (Malý, 2003, s. 110,112) Pro destičkovou odpověď jsou významné receptory P2Y₁ a P2Y₁₂. Podtyp P2X₁ složí jako iontový kanál pro vápník, jinak ale v procesu agregace destiček nehraje žádnou roli. Ionty vápníku stimulují aktivaci fosfolipázy A2 a dalších aktivačních procesů uvnitř destiček. (Bultas, 2010, s. 40)

Pokud není impulz ADP příliš silný, dochází k reverzibilnímu spojení mezi glykoproteinovou oblastí destičky a navázaným fibrinogenem. Při dostatečně velké koncentraci ADP, dojde k sekreci obsahu denzních granúl, vyplaví se další ADP a destičky tak zůstanou v těsném kontaktu. (Pecka, 2006, s. 117-118)

2. 4. 2 Tromboxan A₂

Tromboxan A₂ (TXA₂) je aktivační prostaglandín, který vzniká v destičkách působením enzymu cyklooxygenázy v metabolismu kyseliny arachidonové. Podobně jako ADP působí TXA₂ na aktivaci destiček navázáním na specifické receptory, a tím dojde ke stimulaci sekrece ADP. (Pecka, 2006, s. 120)

2. 4. 3 Kolagen

Propojením kolagenových vláken se specifickými receptorovými místy na membráně destiček vzniká interakce, která aktivuje destičky a vyvolává jejich agregaci. Kolagen aktivuje destičky pouze v nativním uspořádání ve formě polymeru a za přítomnosti ADP. Nejprve dochází k adhezi destiček na kolagen v místě specifických receptorů, kde svoji roli sehrává také interakce jeho pozitivního náboje s negativně nabitým povrchem destiček. Po navázání destiček na kolagen dochází k mnoha interakcím a vyvolání agregačního signálu. (Pecka, 2006, s. 114) (Kubisz, 1987, s. 26-27)

2. 4. 4 Faktor aktivující destičky

Faktor aktivující destičky (PAF) je produkován jak trombocyty, tak buňkami účastnících se zánětlivých procesů (neutrofilů, monocytů, makrofágů). Aktivace destiček je uskutečňována jeho vazbou na specifický membránový receptor a iniciací fosfoinozitolového cyklu, nebo snížením hladiny cAMP v destičkách. Indikace agregace je závislá na množství PAF. (Nosál, 1990, s. 50-52)

2. 4. 5 Adrenalin

Adrenalin neboli epinefrin, aktivuje destičky a zesiluje aktivační účinky ADP a trombinu. Sám o sobě vyvolá agregaci, pouze pokud jeho dávka výrazně přesahuje fyziologické hodnoty. Destičky se po opakované indukci adrenalinu stávají vůči němu odolné. Adrenalin se vážně na α_2 -adrenergní receptory na povrchu destiček a dochází ke stimulaci vazby fibrinogenu a vWF, a dále inhibici aktivity adenylcyklázy. Následně dochází k uvolnění ADP ze zásobních granulí a syntéze TXA₂. Adrenalin patří mezi slabé induktory a jím vyvolaná agregace je závislá na jeho sekreci. (Kubisz, 1987, s. 29) (Hyphen Biomed, 2014)

2. 4. 6 Trombin

Trombin patří mezi nejsilnější aktivátory destiček, kde vyvolává změnu tvaru, agregaci destiček a také jejich sekreci. Rovněž se podílí na přetočení fosfolipidové dvojvrstvy a uvolňování kyseliny arachidonové. (Kubisz, 1987, s. 26)

Vzniká na povrchu trombocytů účinkem protrombinázy, která odštěpí z molekuly protrombinu fragmenty a aktivuje ho na trombin. Krevní destičky aktivuje prostřednictvím proteázou aktivovaného receptoru PAR-1 a PAR-4, jež jsou spojeny s G proteiny. (Pecka, 2006, s. 114)

Při testování funkce destiček aktivovaných receptorem PAR-1 *in vitro*, nelze jako induktor používat trombin, jehož působením by došlo ke spuštění tvorby fibrinu ve vzorku a vzniku fibrinové zátky. Místo něj se používá peptid TRAP-6 stimulující receptor PAR-1, který je velmi silným aktivátorem destiček. (Multiplate® TRAPtest, 2015)

2. 4. 7 Kyselina arachidonová

Arachidonová kyselina je mastná kyselina přítomná v zásobních granulích destiček a je uvolňována z membránových fosfolipidů účinkem fosfolipázy A₂. Působením enzymů dochází ke vzniku prostaglandinu, který je dále přeměněn na tromboxan A₂, který slouží také jako induktor agregace destiček. (ABP Ltd, 2011)

Kyselina arachidonová se řadí mezi velmi silné induktory destiček. Jejím působením *in vitro* v plazmě bohaté na destičky, dochází ke zvýšené spotřebě kyslíku a vyplavení tromboxanu A₂ z granulí a následně k agregaci destiček. (ABP Ltd, 2011)

2. 4. 8 Ristocetin

Ristocetin nepatří mezi přirozené inhibitory, ale jeho aktivační účinky se využívají v *in vitro* reakcích. Je to antibiotikum, jehož působením dochází k interakci vWF faktoru glykoproteinových receptorů GPIb na povrchu destiček. Ristocetin se naváže na vWF za vzniku komplexu, který se dále váže na GPIb a následně dojde k aktivaci a agregaci destiček. (Roche Diagnostics, 2012)

2. 5 Protideštičková léčba

Cílem protideštičkové léčby je inhibice některé fáze tvorby destičkové zátky, tzv. bílého trombu, který vzniká aktivací destiček po styku s kolagenem. Léčba je zaměřena proti hyperaktivaci destiček a slouží jako prevence proti primární či sekundární ateroskleróze, která je příčinou vážných chorob a jsou často hlavní příčinou úmrtí v naší civilizaci. (Poul, 2012, s. 79)

Při léčbě se využívá řada látek, které ovlivňují destičkové procesy v různých fázích od adheze až po vytvoření destičkové sraženiny a její následné smrštění. Antiagregační léčba je namířena proti shlukování krevních destiček a tvorbě primární hemostatické zátky. K tomuto účelu se jako inhibitor agregace užívá především kyselina acetylsalicylová (ASA), thienopyridiny, či inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa a další látky. (Penka, 2004, s. 142)

2. 5. 1 Kyselina acetylsalicylová

Kyselina acetylsalicylová (ASA) patří k nejstarším a základním inhibitorům agregace destiček. ASA ireverzibilně inaktivuje cyklooxygenázy 1 (COX 1), což vede k výrazné regulaci produkce až blokaci syntézy prostanooidů mezi nimi TXA_2 a následnému snížení shlukování destiček po celou dobu jejich životnosti, tj. 7-10 dnů. (Poul, 2012, s. 80) (Laňková, 2013, s. 5) K ireverzibilní inaktivaci dochází z důvodu chybějícího jádra krevní destičky a tudíž absence genetické výbavy pro tvorbu enzymů potřebných k syntéze prostanooidů. (Malý, 2005, s. 160)

Inhibice COX 1 v trombocytech je účinná již při dávkách 30 mg/den, dostatečná klinická účinnost se udává od 80 mg/den. K blokaci prostanooidů v endotelu destičky dochází až při dávkách 325 mg/den. Díky dobrému vstřebávání ASA v trávicím traktu dochází k maximální inhibici agregace za 30-40 minut po užití. (Poul, 2012, s. 80)

Přestože jsou dávky ASA při léčbě zpravidla nízké, nelze vyloučit nežádoucí účinky jako poškození žaludeční sliznice, či provokace astmatických záchvatů. (Lüllmann, 2012, s. 202)

2. 5. 2 Thienopyridiny

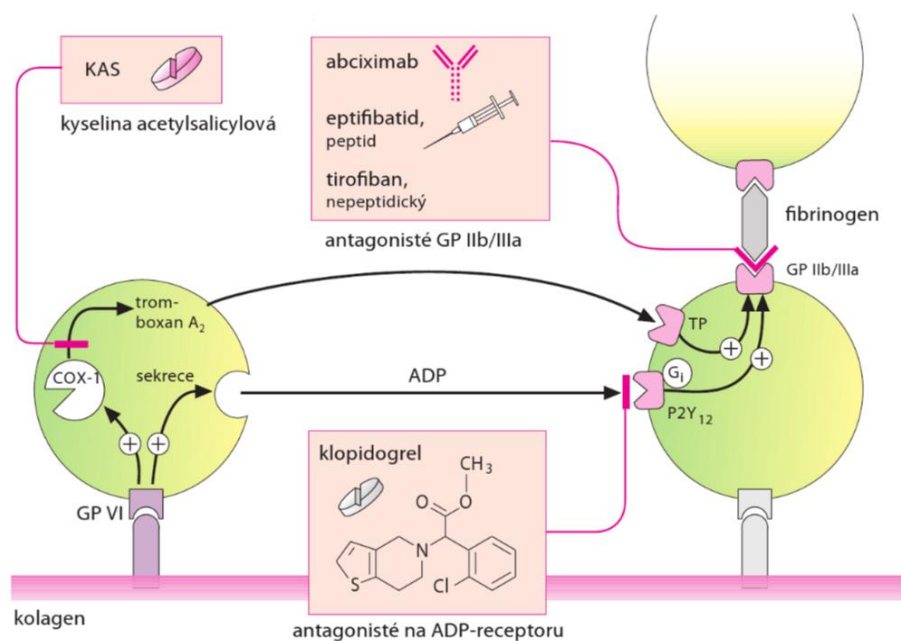
Thienopyridiny patří mezi blokátory destičkových receptorů ADP typu $P2Y_{12}$. Na povrchu destiček jsou přítomny dva typy ADP receptorů kontrolující funkci trombocytu. Protideštičkovou léčbou lze zatím ovlivnit pouze receptory typu $P2Y_{12}$, které

se podílejí na aktivaci destiček a hrají klíčovou roli v procesu agregace. (Malý, 2005, s. 830)

Mezi nepřímo působící inhibitory receptorů P2Y₁₂ řadíme thienopyrimidinové deriváty tiklopidin a klopidoogrel, které blokadí ADP zabraňují navázání na fibrinogen pomocí glykoproteinových receptorů GPIIb/IIIa. Nevýhodou těchto induktorů je jejich nezbytná bioaktivace a pomalejší nástup účinku. (Poul, 2012, s. 80-81) V játrech se působením cytochromu P450 přeměňují na aktivní metabolit, který se ireverzibilně váže na P2Y₁₂ receptory destiček a tím se inhibuje agregace trombocytu indukovaná ADP po celou dobu života blokováného trombocytu. (Lüllmann, 2012, s. 156)

2. 5. 3 Inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa

Jako inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa se využívají látky podávané parenterálním způsobem, tj. mimo trávicí ústrojí. Perorální podání doposud vedlo ke zvýšenému riziku krvácivých komplikací a vzniku protrombotických stavů po vysazení takto podávaných látek. (Poul, 2012, s. 81) Při léčbě se využívá schopnost látek blokovat vazebný protein fibrinogenu, čímž se zabrání vytvoření destičkové sítě pospojované fibrinogenem. (Lüllmann, 2012, s. 156) Mezi látky využívané k blokaci GP IIb/IIIa proteinu se využívá zejména abciximab, tirofiban a eptifibatid, které se od sebe liší dobou účinku. Zatímco abciximab blokuje GP IIb/IIIa řádově 24-48 hodin, účinky eptifibatidu a tirofibanu odezní během několika sekund. (Lüllmann, 2012, s. 156)



Obr. 17 Inhibitory agregace krevních destiček (Lüllmann, 2012, s. 157)

3 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je stanovení referenčních rozmezí hodnot u transfuzních trombocytárních přípravků měřením funkce krevních destiček metodou impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate® (Roche, Germany).

Dílčím cílem je stanovení referenčních rozmezí hodnot u transfuzních přípravků trombocytů v plazmě před zamražením a jejich komparace s referenčním rozmezím peptidu aktivující trombinový receptor, tzv. TRAP měřeným na analyzátoru Multiplate v plné krvi dárců krve.

Dalším cílem je porovnat získané hodnoty agregace u čerstvých transfuzních trombocytárních přípravků z aferézy s kryotrombocyty po rozmrazení, jejichž testování je prozatím ve výzkumné fázi.

4 Metodika práce

4.1 Definice souboru

Do vyšetřovaného souboru bylo zařazeno 94 anonymních dárců krve s věkem v rozmezí 18 – 65 let a rovnoměrným zastoupením mužů a žen. Jednalo se o zdravé jedince neužívající žádné léky spojené s antiagregační léčbou. Vzorek krve pro stanovení funkce krevních destiček byl odebrán dle standardních operačních postupů v odběrovém centru OHKT Ústřední vojenské nemocnice v Praze.

4.2 Použitý materiál

4.2.1 Diagnostika

- Diluent - Fyziologický roztok 0,9% NaCl
- TRAPtest (Multiplate[®] analyser; REF: 06675883; Roche)

4.2.2 Biologický materiál

- Kryokonzervované trombocyty (OHKT ÚVN v Praze)
- Plná krev odebraná do hirudinu (OHKT ÚVN v Praze)
- Trombocyty z aferézy ($> 300 \times 10^9 / TU$) (OHKT ÚVN v Praze)

4.2.3 Spotřební materiál

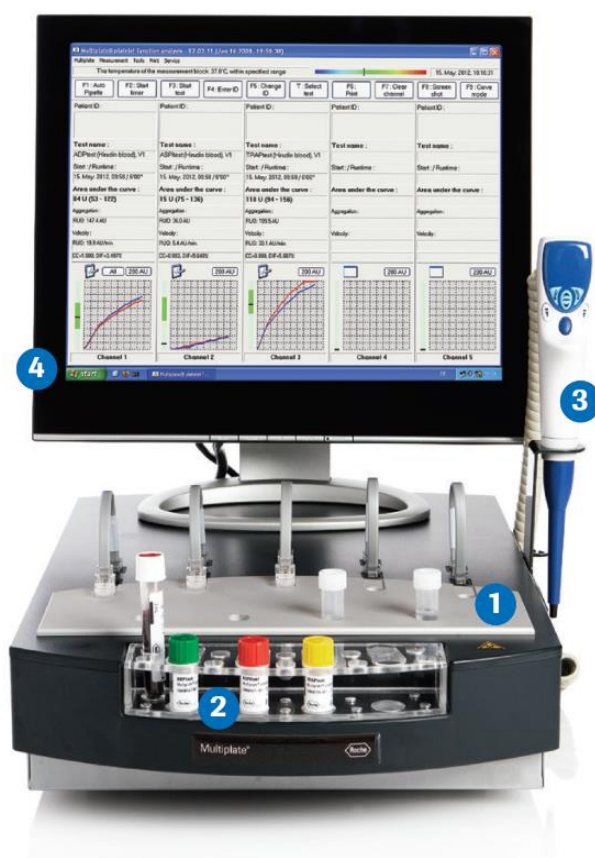
- Hirudin Blood Tube 3 ml (REF: 06675751; Roche)
- Multiplate test cells (REF: 06675590; Roche)
- Tips for eLine pipette (REF: 06675638; Roche)

4.3 Příklad

- Multiplate[®] analyser (Roche; výrobní číslo: 101577)

Multiplate[®] analyzer (MEA – Multiplate Electrode Aggregometry)

Analyzátor Multiplate[®] je zařízení pracující na principu impedanční agregometrie. Slouží k vyšetření funkčních defektů krevních destiček a monitorování protideštičkové léčby, kdy analyzátor detekuje pouze aktivované destičky. Adheze a agregace destiček se monitoruje pomocí několika testů (ADPtest, ASPtest, COLtest, RISTOtest, TRAPtest), při kterých se ke vzorku přidávají příslušné induktory, které aktivují destičky. Samotné měření se provádí v jednorázových kyvetách, které obsahují dva senzory, každý tvořený dvěma elektrodami pokryté vrstvou stříbra. Tím je zajištěna vnitřní kontrola kvality každého měření. Jednotlivé kyvety jsou propojeny s 5 nezávislými měřicími kanály, které umožňují měření pěti vzorků současně. Promíchání vzorku během inkubace je zajištěno magnetickým míchadlem potaženým teflonem, jehož rychlost je až 1000 otáček za minutu. Součástí analyzátoru je také panel pro reagentie, 4 vyhřívané pozice pro inkubaci vzorku na 37°C, elektronická automatická pipeta a software. (Roche, 2015) (Paniccia, 2009, s. 535-536)



Obr. 20 Multiplate[®] analyzátor (Roche, 2015)

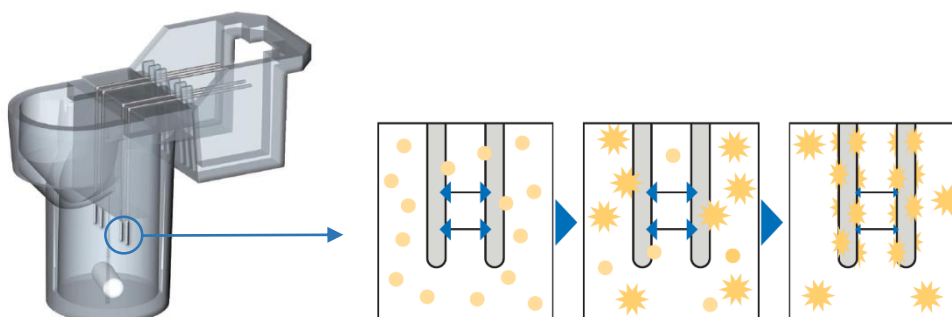
1 Měřicí oblast; 2 Panel pro reagentie a vzorky; 3 Elektrická automatická pipeta; 4 Software

4. 3. 1 Princip měření

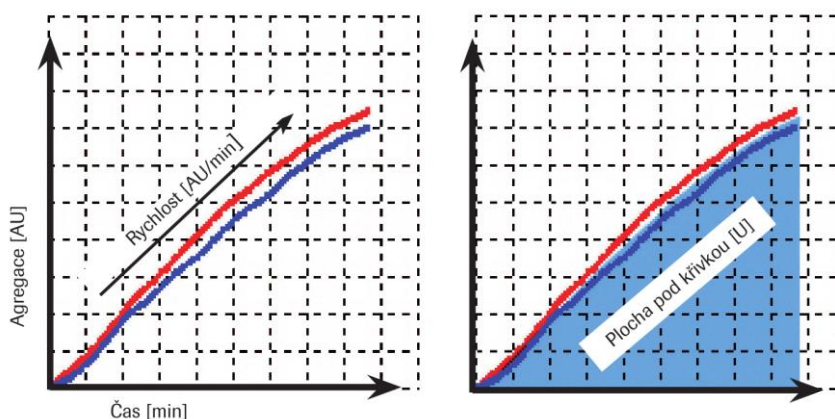
Přidáním vhodného induktoru se zahájí proces aktivace a agregace krevních destiček. Destičky se přichycují na povrch elektrod, což se projeví nárůstem impedance (odporu) mezi elektrodami.

Analyzátor kontinuálně zaznamenává změny impedance a agregaci destiček. Impedance je převáděna na arbitrární jednotky agregace (AU) a následně zaznamenána do grafu jako dvě křivky v závislosti na čase. Křivky představují dva parametry, a to **agregaci** (Agg), což je nárůst impedance během analýzy, a **rychlost** (velocity - Vel), což je maximum směrnicí agregační křivky. Agregace se udává v jednotkách [AU], rychlost jako [AU/min]. Obě křivky jsou hodnoceny pomocí dvou nezávislých čidel v měřicích kanálech. Vypočítané parametry jsou průměrem hodnot jednotlivých křivek.

Celková aktivita destiček je vyjadřována pomocí plochy pod agregační křivkou (AUC), která je ovlivněna celkovou výškou a směrnicí agregační křivky. Plocha AUC se nejčastěji vyjadřuje v jednotkách [U], případně [AU*min]. (Hoffmann-La Roche Ltd., 2013-2015)



Obr. 23 Přichycení aktivovaných destiček na povrch elektrod (upraveno dle Roche, 2015)



Obr. 26 Parametry analyzátoru Multiplate (Hoffmann-La Roche Ltd., 2013-2015)

4. 4 Postup stanovení

4. 4. 1 Odběr a příprava trombocytů

Veškerý biologický materiál použitý pro měření na analyzátoru Multiplate[®] byl získán od zdravých dárců krve, neužívající žádné léky. Odběr krve a trombocytů byl proveden v odběrovém centru OHKT ÚVN v Praze. Při odběru byly dodrženy standardní operační postupy a podmínky spojené s odběrem biologického materiálu.

4. 4. 1. 1 Kryokonzervace trombocytů

Materiál

- Trombocyty z aferézy (280 až 320 ml, min obsah trombocytů: 300×10^9 /TU)
- Infuzní souprava Intrafix, vzorkovací vak - pedivak, transportní vak R4R2074
- Roztok 75ml DMSO 27%

Zařízení

- Sterilní svářečka hadiček Fresenius
- Svářečka (zatavovačka) hadiček Fresenius Composeal
- Velkoobjemová centrifuga Hereaus 6000i
- Laboratorní třepačka TPM-21
- Infuzní stojan
- Infuzní set
- Plastové svorky

Postup

Vak s trombocyty z aferetického odběru jsme vizuálně zkontrolovali (barva, pohyb trombocytů, výskyt agregátů). Následně jsme odebrali vzorek do označeného vzorkovacího váčku, který je součástí odběrového setu. Váček se vzorkem jsme odstříhli z odběrového setu a použili pro naše měření na analyzátoru Multiplate[®].

Zbylé vaky jsme odvzdušnili a oddělili. Vak s trombocyty jsme zvažili a hmotnost poznamenali na vak s trombocyty. Dále jsme sterilní svářečkou na vak s trombocyty napojili infuzní soupravu, na které jsme pomocí zatavovačky zkrátili jeden port o 1/2 délky od rozdvojky na 13,5 cm. Následně jsme vak s trombocyty umístili na třepačku s nastavenými hodnotami 180 otáček/min.

V dalším kroku jsme na infuzní stojan umístili roztok 27% DMSO, odezinfikovali uzávěr lahvičky a penetrovali infuzní soupravou. Druhý konec soupravy jsme napojili na vak s trombocyty. Povoláním sterilního sváru i tlačky přetekl roztok DMSO do vaku.

Během přepouštění jsme pozorovali hladinu roztoku tak, aby se do vaku nedostal přebytečný vzduch. Po přemístění roztoku jsme pomocí svářečky (zatavovačky) odstranili infuzní soupravu.

Poté jsme sterilní svářečkou napojili na vak s trombocyty vak určený ke kryokonzervaci označený čárovým kódem dárce. Povoláním sváru přetekl původní obsah aferetického vaku do vaku určeného k zamrazení. Na hadičku mezi oba vaky jsme umístili svorku v zavřené pozici.

Vaky jsme následně centrifugovali při 1940 G, acc. 5, dec.2, 15 min, teplotě 22°C. Po centrifugaci jsme vak s trombocyty vložili do ručního lisu a lisováním přetekl supernatant do prázdného vaku. Důležitým krokem bylo sledování hranice supernatant/trombocyty a ukončení lisování ve chvíli, kdy zůstalo v původním vaku minimum supernatantu a nedošlo ještě k úniku trombocytů. Pomocí svářečky jsme přerušili spojovací hadičku mezi vaky a oddělili je.

Trombocyty ve vaku jsme pomocí buničiny šetrně promíchali tak, aby nedošlo k poškození krevních destiček. Finální produkt jsme zvážili a umístili do jouanu s nastavenou teplotou -80°C. Kryokonzervované trombocyty byly následně skladovány při teplotě -65°C.

4. 4. 1. 2 Rekonstituce kryokonzervovaných trombocytů

Materiál

- Kryokonzervované trombocyty (OHKT ÚVN v Praze)
- Čerstvě mražená plazma krevní skupiny AB (OHKT ÚVN v Praze)

Zařízení

- Rozmrazovač plazmy TOOL PR 50-300
- Bezkontaktní teploměr
- Sterilní svářečka hadiček Fresenius
- Svářečka (zatavovačka) hadiček Fresenius Composeal
- Válečkové míchadlo zkumavek

Postup

Z mrazicího boxu jsme vyndali vaky s čerstvě mraženou plazmou a kryokonzervovanými trombocyty. Plazmu jsme vložili na 15 minut do vodní lázně rozmrazovače s teplotou vody 36-38°C. Po 15 minutách jsme teploměrem zkontrolovali teplotu plazmy a po dosažení 28°C jsme vložili do rozmrazovače kryokonzervované trombocyty současně s plazmou. Po uplynutí 5 minut jsme změřili teplotu obou přípravků, která musí být v rozmezí 30-35°C. Pokud je dosažena správná teplota je důležité zkontrolovat vzhled obou vaků.

Následně jsme trombocyty 30 sekund na buničité podložce šetrně promíchali tak, aby nedošlo k poškození krevních destiček. Po promíchání jsme vak s trombocyty sterilní svářečkou napojili na vak s plazmou a uvolněním sváru došlo k přetékání plazmy do vaku s trombocyty. Během přetékání plazmy jsme vak s trombocyty krouživými pohyby rukou promíchávali s přitékající plazmou. Po přemístění plazmy jsme postup opakovali a nechali přetékat trombocyty s plazmou do prázdného vaku od plazmy a následně opět vrátit do vaku od trombocytů. Po přelití veškerého obsahu jsme pomocí svářečky (zatavovačky) oddělili prázdný vak. Rozmražené trombocyty byly skladovány na tromboagitátoru při teplotě 22°C +/- 2°C a to po dobu maximálně 6 hodin.

4. 4. 2 Příprava vzorku pro měření agregace destiček na Multiplate®

4. 4. 2. 1 Vyšetření z plné krve

Plná venózní krev se pro měření agregace destiček na analyzátoru Multiplate® odebírá do speciálních 3,0 ml vakuet Hirudin Blood Tube for Multiplate® analysis (Roche). Koncentrace hirudinu v odběrových zkumavkách je 15 µg/ml. Hirudin má protisrážlivou aktivitu a působí jako přímý inhibitor trombinu bez interference s fyziologickými hladinami vápníku. Krev je potřeba nechat po jemném promíchání po odběru stát ve stojánku po dobu 30 minut, při teplotě místnosti a vyšetřit do 2 hodin po odběru.

4. 4. 2. 1 Vyšetření z čerstvých trombocytů z aferézy deleukotizovaných (TAD)

Pro vyšetření agregace destiček ze vzorku TAD na analyzátoru Multiplate® byly trombocyty odebrané pomocí automatického separátoru centrifugací z plné krve, tzv. trombocytferézou. Deleukotizované trombocyty, tj. bez obsahu bílých krvinek, byly separovány a odebrány do odběrových vaků. K samotnému měření byl použit pouze vzorkový vak s příměsí DMSO (dimetylsulfoxidu), který se chová jako konzervant, ale také jako inhibitor aktivace destiček. Ze vzorkového vaku byly do sterilní zkumavky odebrány 4 ml TAD. Obsah trombocytů ve vzorku k vyšetření agregace musí být větší než 300×10^9 TU.

4. 4. 2. 2 Vyšetření z kryokonzervovaných trombocytů (TADK)

Pro měření agregace destiček z kryokonzervovaných trombocytů byly odebrány 4 ml vzorku do sterilní zkumavky z rozmrazených TADK po rekonstituci v plazmě (viz. 4. 4. 1. 2 Rekonstituce kryokonzervovaných trombocytů).

4. 4. 3 Měření agregace destiček na analyzátoru Multiplate®

4. 4. 3. 1 Měření agregace destiček z plné krve

Měřicí kyveta se umístí do měřicí pozice a k sensorům na kyvetě se připojí kabel s čidlem. Do softwaru se zadají identifikační údaje vyšetřovaného jedince a zvolí se typ testu pro měření agregace. Pro naše účely byl vybrán TRAPtest, při kterém se sleduje míra agregace po indukci peptidem aktivujícím trombinový receptor (TRAP-6). Do kyvety se automatickou pipetou přidá 300 μ l diulentu, tj. fyziologického roztoku (0,9% NaCl), vyhřátého na 37°C a 300 μ l hirudinizované krve. Vzorek v kyvetě necháme inkubovat 3 minuty. Po celou dobu inkubace dochází k promíchávání vzorku pomocí magnetického míchadla na dně kyvety. Po zaznění zvukového signálu ohlašujícího konec inkubace se ke vzorku přidá 20 μ l induktoru TRAP-6 a zahájí se měření. Po 6 minutách jsou výsledkem dvě křivky zaznamenané v grafu.

Tabulka 1 Pipetovací postup

1 Pipeta	300 μ l fyziologického roztoku + 300 μ l hirudinizované krve
2 Inkubace	3 minuty
3 Pipeta	20 μ l TRAP-6
4 Měření	6 minut

4. 4. 3. 2 Měření agregace destiček z TAD nebo TADK

Měřící kyveta se umístí do měřící pozice a k senzorům na kyvetě se připojí kabel s čidlem. Do softwaru se zadají identifikační údaje vyšetřovaného jedince a zvolí se typ testu pro měření agregace. Pro naše účely byl vybrán TRAPtest, při kterém se sleduje míra agregace po indukci peptidem aktivujícím trombinový receptor (TRAP-6). Do kyvety se automatickou pipetou přidá 450 μ l roztoku PBS o pH 7,2 a 150 μ l TAD nebo TADK. Vzorek v kyvetě necháme inkubovat 3 minuty. Po celou dobu inkubace dochází k promíchávání vzorku pomocí magnetického míchadla na dně kyvety. Po zaznění zvukového signálu ohlašujícího konec inkubace se ke vzorku přidá 20 μ l induktoru TRAP-6 a zahájí se měření. Po 8 minutách jsou výsledkem dvě křivky zaznamenané v grafu.

Tabulka 2 Pipetovací postup TAD/TADK

1 Pipeta	450 μ l PBS o pH 7,2 + 150 μ l TAD/TADK
2 Inkubace	3 minuty
3 Pipeta	20 μ l TRAP-6
4 Měření	8 minut

4. 4. 3 Kontrola funkce TADK měřením monoklonálních protilátek pomocí průtokové cytometrie.

Průtokovou cytometrií lze monitorovat aktivační stav destiček in vivo nebo nepřímo hodnotit schopnost destiček aktivovat se in vitro po přidání trombocytárních agonistů jako například TRAP-6. Trombocytární marker CD41 hraje svou roli při shlukování trombocytů. Pro ověření aktivace destiček slouží znaky CD62 a CD63, které nejsou na trombocytech v klidovém stavu exprimovány. Zároveň jsou specifické trombocytární markery exprimovány na povrchu mikropartikulí, které jsou uvolňovány trombocyty v nefyziologických podmínkách. (Marinov, 2011, s. 12)

Při průtokové cytometrii jsou jednotlivé buňky obarvené různými barvivými, tzv. fluorochromy. V izotonickém roztoku (nosná kapalina) protékají velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou proudí nosná tekutina. To usměrní buňky do tenkého proudu, kde postupují jednotlivě průtokovou komůrkou a v ní protínají světelný paprsek. Světlo vznikající interakcí buněk je rozděleno systémem hranolů, optických filtrů a zrcadel podle vlnové délky emitované fluorescence. Separované světlo dopadá na jednotlivé detektory, které vytvářejí elektrické impulsy a jsou zesíleny fotonásobičem. Vzniklé elektrické signály, které charakterizují každou jednotlivou buňku řadou parametrů, jsou poměrně složitě amplifikovány, digitalizovány a počítačově zpracovávány. (Heidekerová, 2009, s. 11)

Cytometrické stanovení monoklonálních protilátek na trombocytech bylo provedeno na Klinice infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN dle následujícího postupu.

Materiál

- Trombocyty z plné krve (vzorek A a B) (OHKT ÚVN v Praze)
- Kryokonzervované trombocyty – TADK (OHKT ÚVN v Praze)
- Plazma krevní skupiny AB (OHKT ÚVN v Praze)

Reagencie

- Tyrode`s/HEPES buffer – THB (pH 7.4)

Použité monoklonální protilátky

- | | |
|--|--|
| – IgG1 FITC (c = 1 mg/ml) | – CD62P PE (c = 20 µl/100 µl krve) |
| – CD41 FITC (c = 20 µl/100 µl krve) | – IgG1 APC (c = 0,1 mg/ml) |
| – IgG1 PE (c = 0,1 mg/ml) | – CD63 APC (c = 10 µl/ 100 µl krve) |

Zařízení

- Cytometr BD Canto II (Beckman)

Postup

Krevní plazma byla naředěna násobnou řadou (0x, 2x, 4x, 8x, 16x). Jednotlivé vzorky plné krve a TAKD byly zředěny THB pufrem (900 μ l pufru + 100 μ l krve; 975 μ l pufru + 25 μ l TADK). Následně bylo k 10 μ l plazmy všech ředění přidáno 40 μ l zředěné krve či destiček. Po 20 minutové inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 500 μ l THB pufru. Připravené vzorky byly změřeny proti kontrole.

5 Výsledky

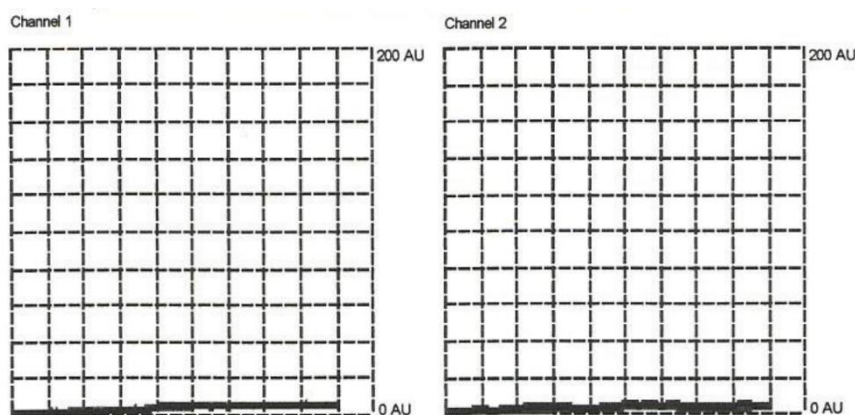
Pro srovnávání všech sledovaných primárních i sekundárních veličin mezi skupinami i uvnitř skupin byly použity párové t-testy (studentův t-test) s $p < 0,05$ při dvoustranném intervalu spolehlivosti. K porovnání a sledování distribuce dat byl využit Shapiro-Wilkův test. Normalita dat byla graficky znázorněna pravděpodobnostními QQ grafy.

Získaná data byla zpracována a vyhodnocena v systému Microsoft Office Excel 2016 a statistické výpočty a grafy byly vytvořeny v programu Statistica 11 společnosti StatSoft (verze 10, DELL, USA).

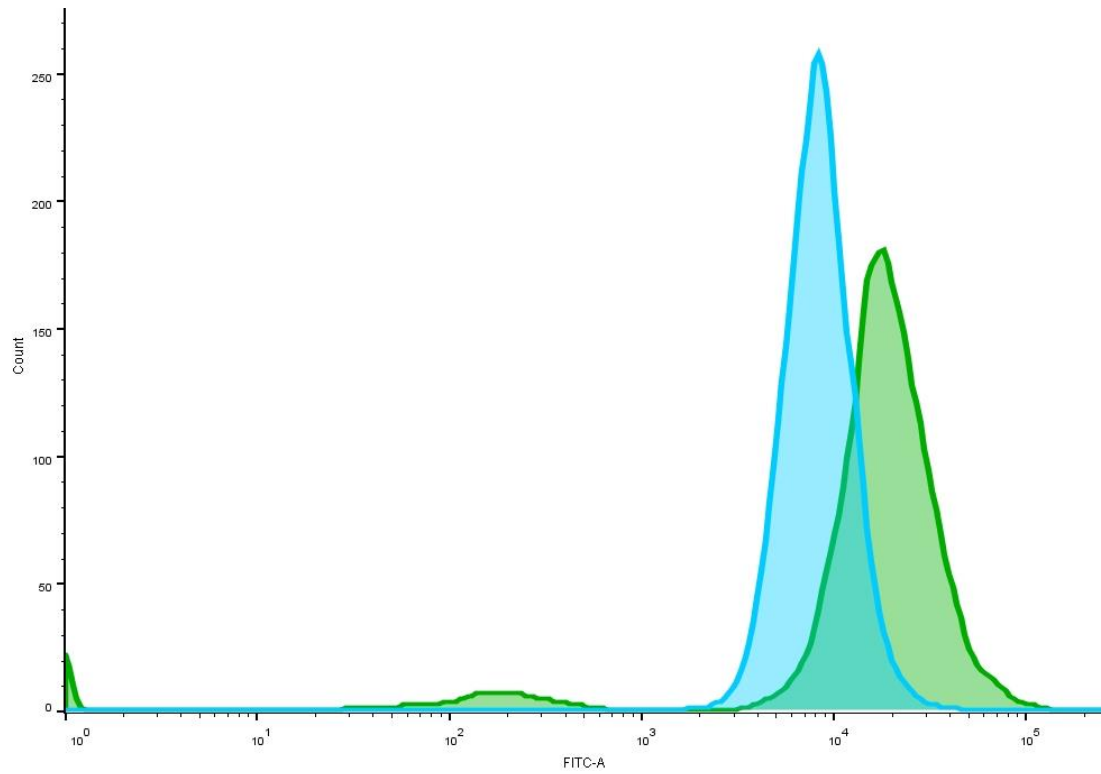
5.1 Vyhodnocení výsledků měření agregace destiček u kryotrombocytů

Na analyzátoru Multiplate[®] byly naměřeny hodnoty agregace krevních destiček u 5 dárců TAD s rovnoměrným zastoupením mužů a žen a věkovým rozmezím 18 – 65 let.

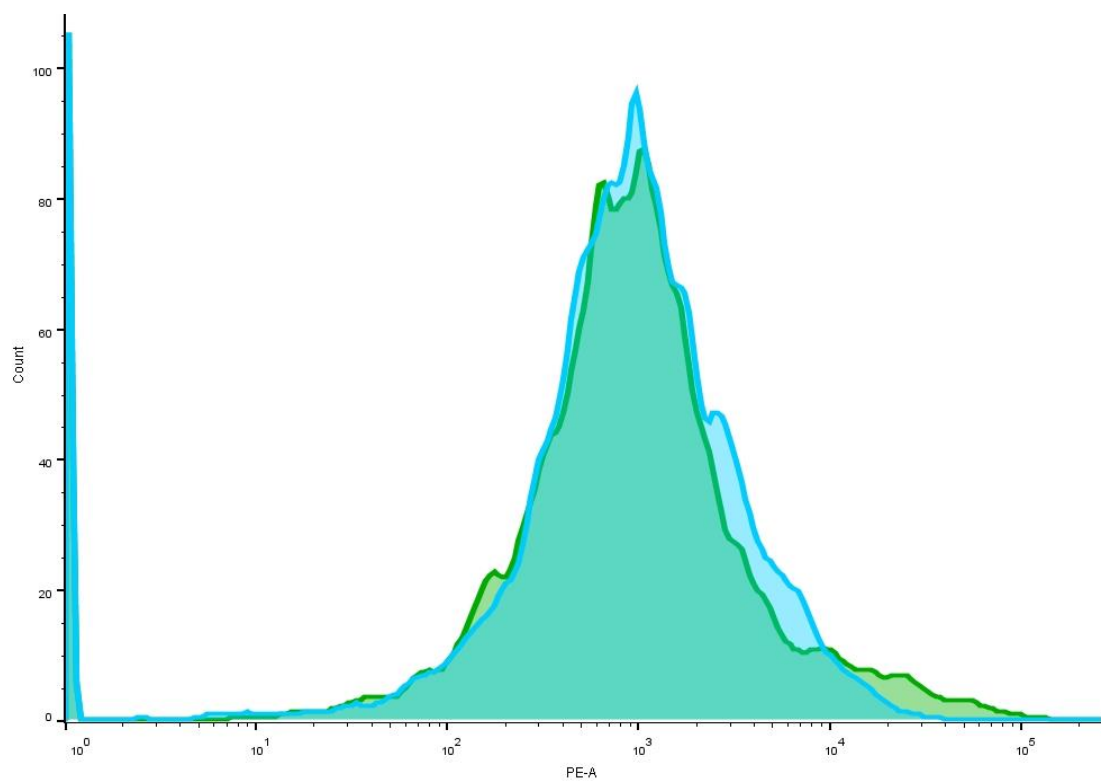
Vzhledem k naměření téměř nulových výsledků a získání rovné křivky (viz. graf 1), byly u vzorků TADK stanoveny monoklonální protilátky na cytometru BD Canto II (Beckman) na Klinice infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN. Výsledky naměřených protilátek byly porovnány u vzorků TADK proti trombocytům z plné krve (viz. grafy 2, 3, 4).



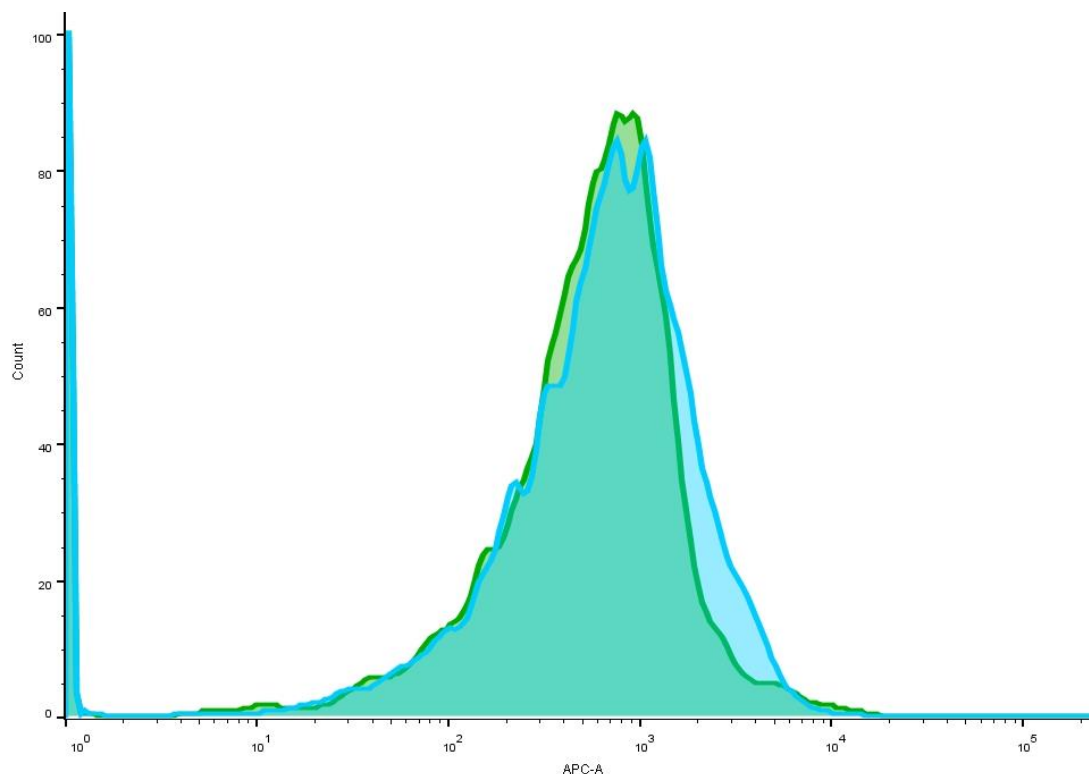
Graf 1 Celková aktivita destiček TRAPtestu u TADK - vzorek 1,2



Graf 2 Porovnání protilátek CD41 u trombocytů z plné krve (modrá barva) a kryotrombocytů (zelená barva)



Graf 3 Porovnání protilátek CD62 u trombocytů z plné krve (modrá barva) a kryotrombocytů (zelená barva)



Graf 4 Porovnání protilátek CD63 u trombocytů z plné krve (modrá barva) a kryotrombocytů (zelená barva)

5. 2 Stanovení referenčních rozmezí

Referenčním rozmezím se rozumí takové hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot (tj. 95% výsledků) získaná měřením referenční populace (soubor jedinců splňující určité předpoklady). Při výběru populace se vybírá náhodný výběr, který představuje výběrovou referenční skupinu, u které se měří výběrové referenční hodnoty a stanovují se výběrové referenční rozložení a meze. Pokud jsou data v normálním rozložení, lze referenční rozmezí vypočítat jako součet či rozdíl aritmetického průměru x a směrodatné odchylky s . Referenční interval je tedy roven $x \pm 1,96 s$. (Racek, 2006, s. 43-48)

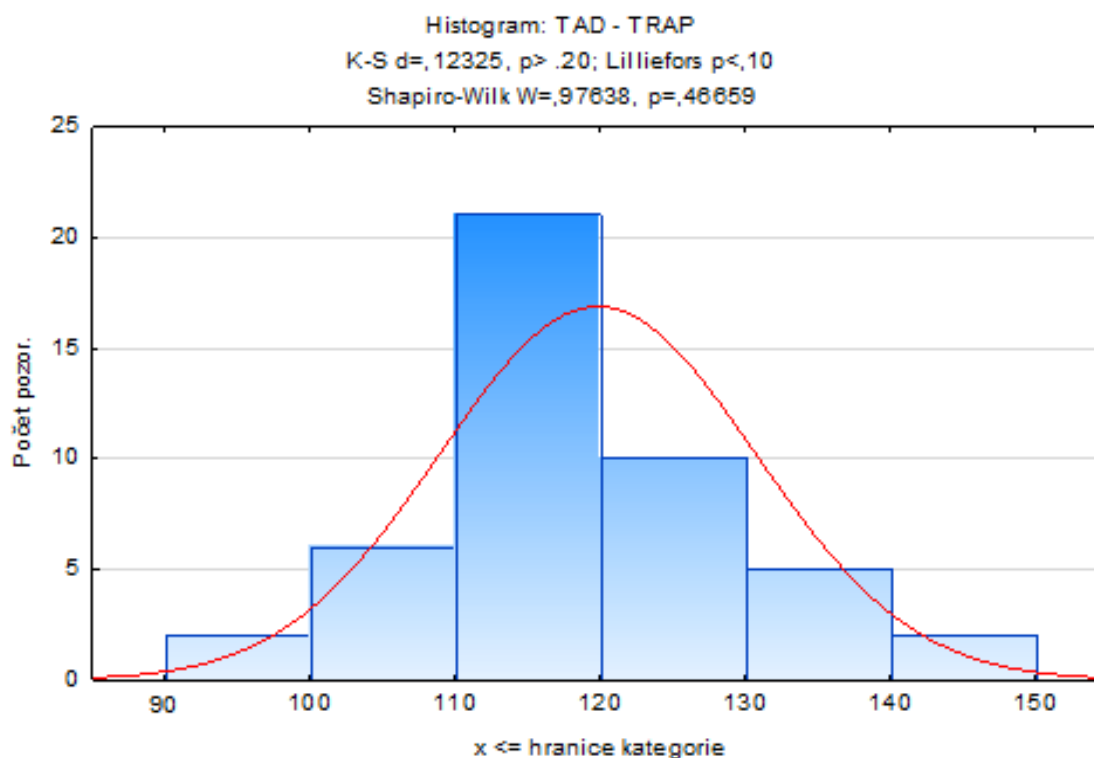
5. 2. 1 Stanovení referenčních rozmezí u trombocytárních přípravků

Pomocí analyzátoru Multiplate® byly naměřeny hodnoty agregace krevních destiček u 46 dárců TAD s rovnoměrným zastoupením mužů a žen a věkovým rozmezím 18 – 65 let. Získané hodnoty agregace krevních destiček pro TRAPtest byly statisticky

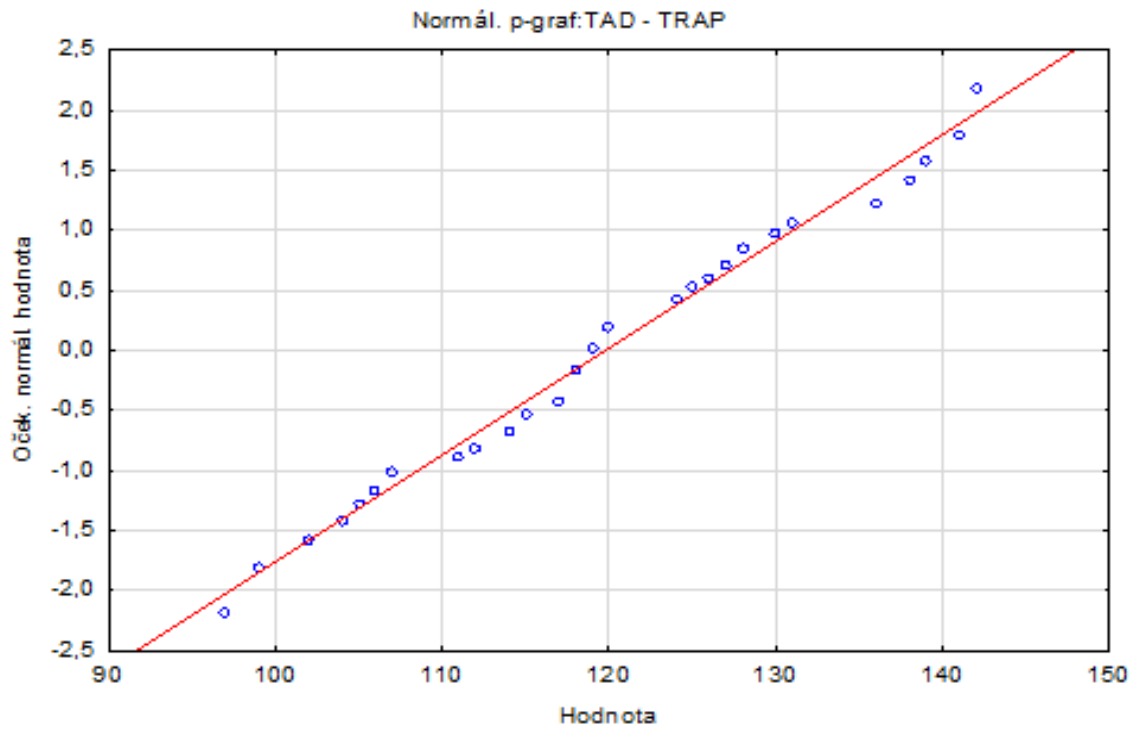
vyhodnoceny na základě ověření normálového rozložení hodnot pomocí Shapiro - Wilkova testu (viz graf 5, 6, 7). Referenční rozmezí bylo stanoveno určením a dosazením hodnot průměr a směrodatná odchylka do vzorce $x \pm 1,96 s$. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 Deskriptivní statistika hodnot TRAPtestu u TAD

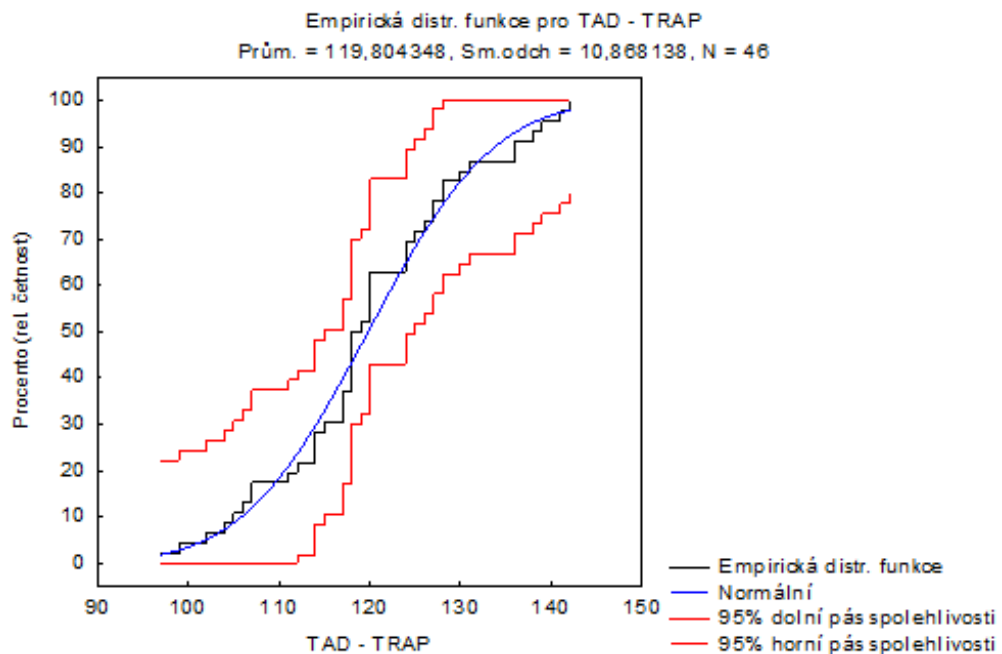
	TRAPtest [U]
Průměr	119,80
Medián	118,50
Minimum	97,00
Maximum	142,00
SD	10,87
1,96 SD	21,30
CV [%]	9,07
Horní referenční mez	141,11
Dolní referenční mez	98,50
Referenční rozmezí	98,50 – 141,11



Graf 5 Normálové rozložení dat TRAPtestu u TAD pomocí histogramu



Graf 6 Normálové rozložení dat TRAPtestu u TAD pomocí pravděpodobnostního QQ grafu



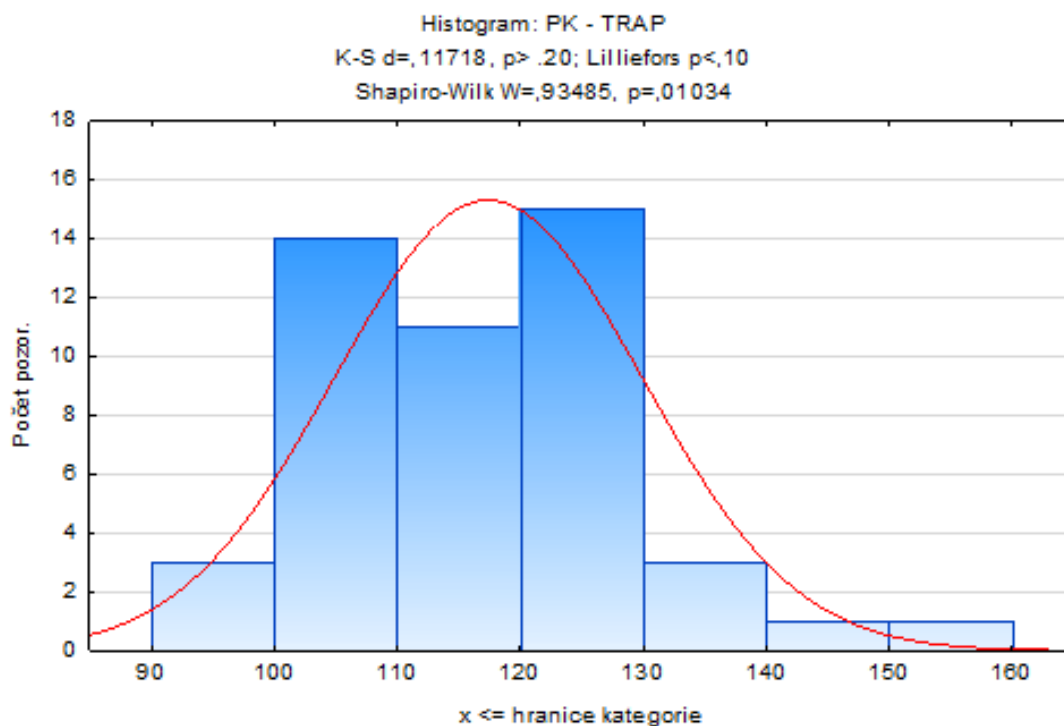
Graf 7 Normálové rozložení dat TRAPtestu u TAD pomocí distribuční funkce

5. 2. 2 Stanovení referenčních rozmezí u trombocytů v plné krvi

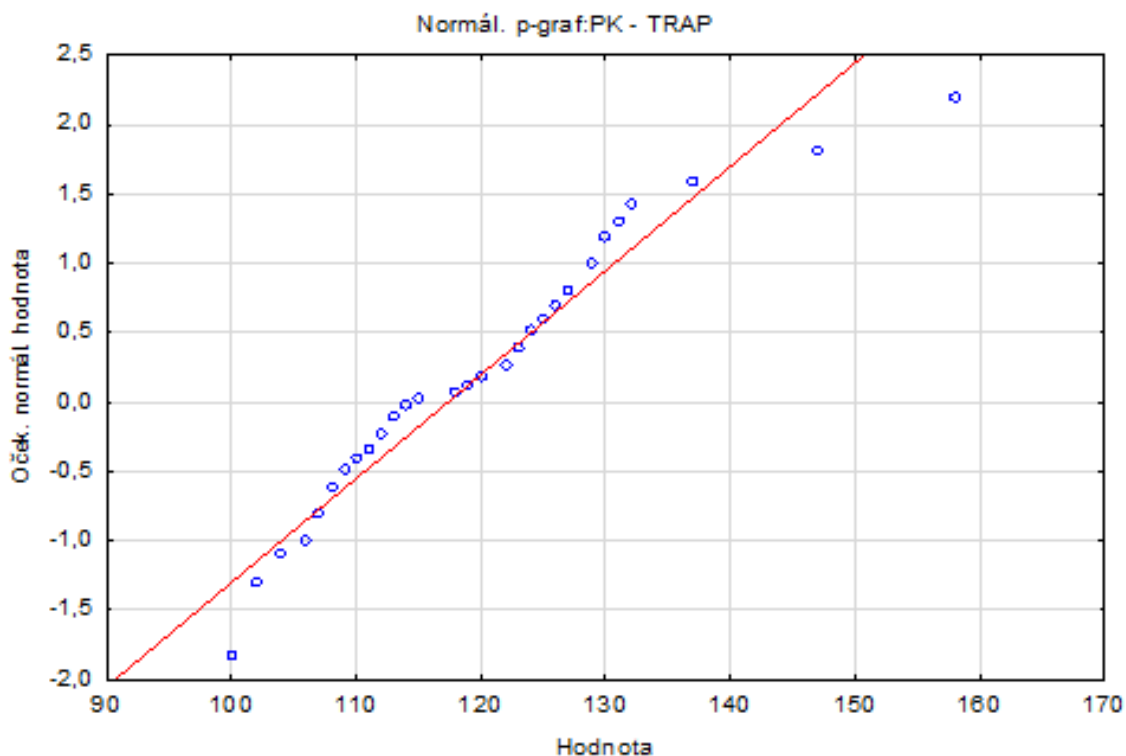
Na analyzátoru Multiplate® byly naměřeny hodnoty agregace krevních destiček u 48 dárců krve s rovnoměrným zastoupením mužů a žen a věkovým rozmezím 18 – 65 let. Získané hodnoty agregace krevních destiček pro trombocyty v plné krvi byly statisticky vyhodnoceny na základě ověření normálového rozložení hodnot pomocí Shapiro - Wilkova testu (viz graf 8, 9, 10). Referenční rozmezí bylo stanoveno určením a dosazením hodnot průměr a směrodatná odchylka do vzorce $x \pm 1,96 s$. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4 Deskriptivní statistika hodnot TRAPtestu u trombocytů z plné krve

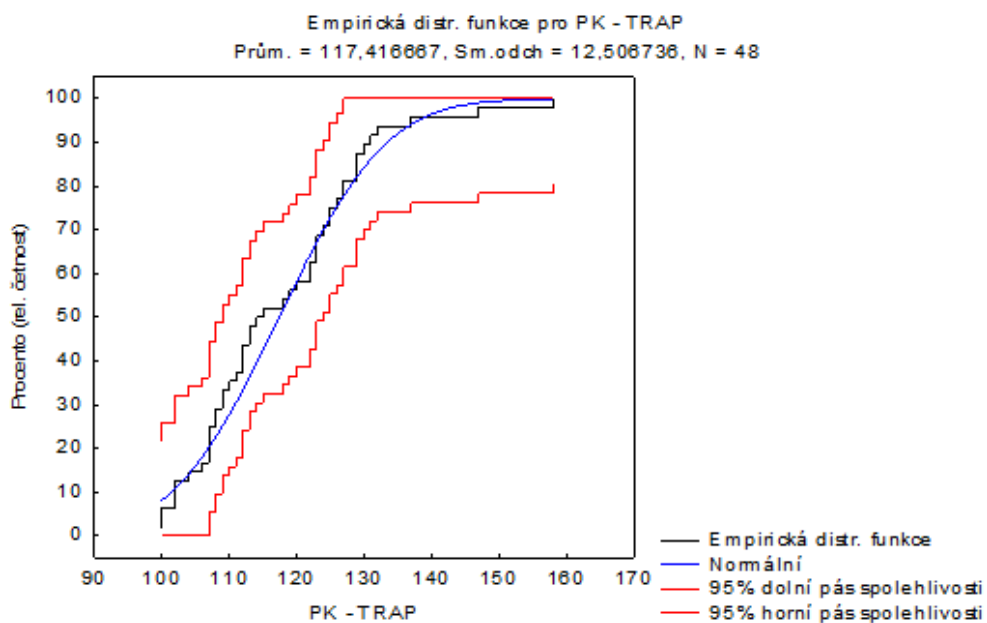
	TRAPtest [U]
Průměr	117,42
Medián	114,50
Minimum	100,00
Maximum	158,00
SD	12,51
1,96 SD	24,51
CV [%]	10,65
Horní referenční mez	141,93
Dolní referenční mez	92,90
Referenční rozmezí	92,90 – 141,93



Graf 8 Normálové rozložení dat TRAPtestu u trombocytů z plné krve



Graf 9 Normálové rozložení dat TRAPtestu u trombocytů z plné krve pomocí pravděpodobnostního QQ grafu



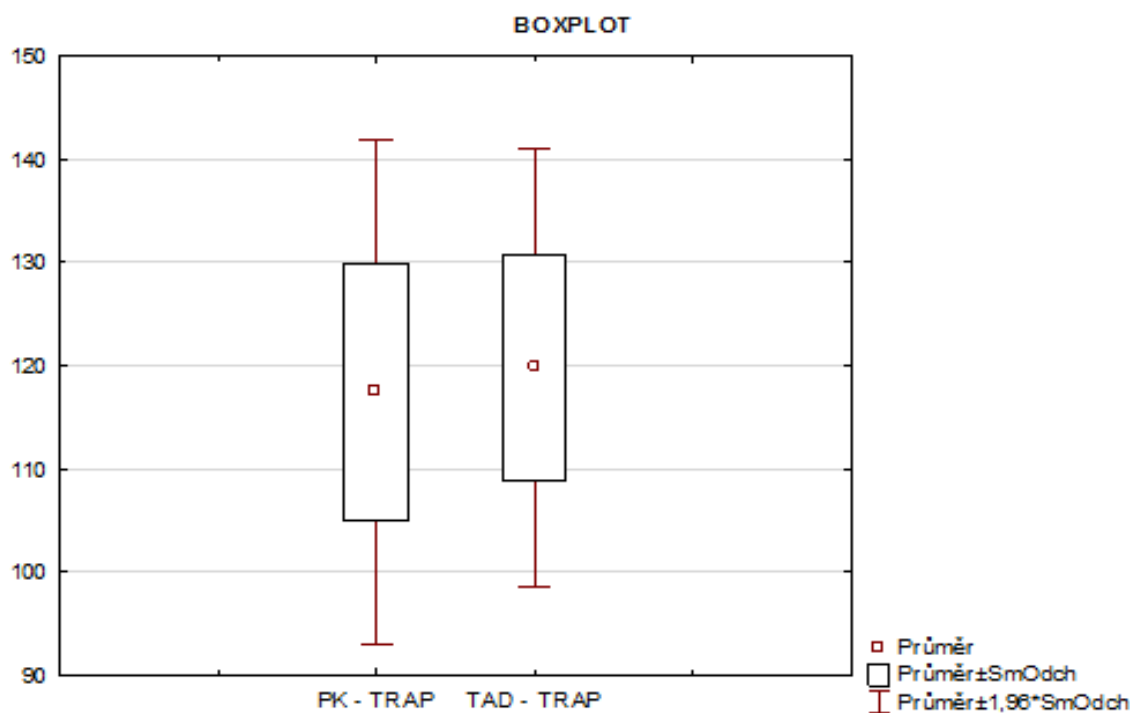
Graf 10 Normálové rozložení dat TRAPtestu u trombocytů z plné krve pomocí distribuční funkce

5.3 Statistické porovnání hodnot měření agregace destiček u trombocytárních přípravků a trombocytů z plné krve

Pro srovnání hodnot agregace krevních destiček u TAD a trombocytů z plné krve byl použit párový t-test s $p < 0,05$ při dvoustranném intervalu spolehlivosti. Při porovnání obou metod nebyl zjištěn významný statistický rozdíl. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 5 a na grafu 11.

Tabulka 5 Porovnání TRAPtestu u TAD a trombocytů z plné krve

	TAD	Trombocyty z PK
Průměr	119,80	117,42
SD	10,87	12,51
1,96 SD	21,30	24,51
p	0,33	



Graf 11 Porovnání TRAPtestu u TAD a trombocytů z plné krve

6 Diskuze

V bakalářské práci jsme se věnovali stanovení funkce krevních destiček pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate® (Roche, Germany).

Analyzátor Multiplate je v současné době v klinických a nemocničních zařízeních poměrně široce využíván. Kromě detekce celkové agregability destiček, včetně detekce počtu a funkce trombocytů, lze analyzátor využít také pro stanovení účinnosti protideštičkové léčby a k odhadu krvácivého rizika před operací. Analyzátor se vyznačuje vysokou citlivostí na nejpoužívanější antiagregační léky, jako je Aspirin® (ASA), Plavix® (Clopidogrel), ReoPro® (Abciximab), Aggrastat® (Tirofiban), Efixent (Prasugrel) a další. (Rahe-Mayer, 2009) (Petricevic, 2016) Možnost měření 5 nezávislých vzorků najednou, bez nutnosti úpravy vzorku centrifugací představuje jednoduché a rychlé vyšetření. Pro analýzu vzorku je zapotřebí jen velmi malý objem krve, který je vyšetřován v doubletu, čímž je zajištěna vnitřní kontrola analýzy vzorku. Mezi další výhody analyzátoru patří široká paleta reagensů pro všechny běžné cesty aktivace krevních destiček, které umožňují oddělené posouzení funkce destiček po přidání různých agonistů. Analyzátor má velmi jednoduchou obsluhu a údržbu. Software analyzátoru zajišťuje precizní systém kontroly kvality a nepožaduje opakované kalibrace měření. (Menkis, 2012)

Využití analyzátoru pro stanovení funkce destiček v trombocytárních přípravcích není v praxi zatím běžné. Oddělení hematologie a krevní transfuze Ústřední vojenské nemocnice v Praze se zabývá studií aplikace analyzátoru Multiplate® právě na trombocytární přípravky. Jeho využití pro potřeby kontroly kvality trombokoncentrátů může být výhodné především díky možnosti detekce počtu a funkce destiček, testování bez nutnosti úpravy vzorku a další výhody popsané výše.

V praktické části bakalářské práce jsme nejprve stanovili referenční rozmezí u transfuzních trombocytárních přípravků, které byly získány od 46 dárců TAD a následně změřeny na analyzátoru Multiplate® (Roche, Germany).

Naměřené hodnoty (viz příloha 9. 1) byly statisticky vyhodnoceny využitím Shapiro - Wilkova testu, kterým jsme ověřili normálové rozložení hodnot. Na grafu 5, můžeme pozorovat rozložení námi naměřených hodnot podél Gaussovy křivky, která je grafickým znázorněním normálového rozložení četností. Výška sloupců odpovídá četnosti výskytu naměřených hodnot v daném intervalu. Šířka sloupce představuje hranici tříd, tj. interval hodnot, ve kterém se námi naměřené hodnoty nacházejí. Z grafu je patrné,

že největší zastoupení námi naměřených hodnot je v intervalu od 110-120 U. Podle rozložení jednotlivých sloupců, které připomíná rozložení Gaussovy křivky, můžeme říci, že námi naměřené hodnoty jsou normálově rozložené. To jsme také potvrdili výpočtem testové statistiky w , jejíž hodnota nám vyšla $w = 0,97638$. Čím více se vypočtená hodnota testové statistiky blíží číslu 1, tím více svědčí pro normalitu.

Pro porovnání jsme použili grafy 6 a 7 znázorňující normálové rozložení hodnot. Graf 6, tzv. pravděpodobnostní graf QQ znázorňuje porovnání kvantilů teoretického rozdělení s naměřenými kvantily. Lineární přímka znázorňuje normálové rozložení dat. Čím blíže jsou body na přímce, tím více se podobají teoretickému rozložení. Protože se naše hodnoty nachází v těsné blízkosti přímky, lze naše hodnoty označit jako normálově rozložené. Graf 7 znázorňuje empirickou distribuční funkci, která leží mezi 95% horním a dolním pásem spolehlivosti. Z grafu lze vyčíst, že všechny naše naměřené hodnoty leží mezi těmito pásy, tudíž spadají do 95% výsledků, které určují referenční rozmezí.

Na základě ověření normálového rozložení dat, jsme si vypočítali hodnoty distribuční statistiky (viz. Tabulka 3). Pro stanovení referenčního rozmezí jsme použili hodnotu průměru ($\bar{x} = 119,80$ U) a směrodatné odchylky ($SD = 10,87$) a jejich dosazení do vzorce $\bar{x} \pm 1,96 s$, kdy hodnota 1,96 představuje koeficient pro 2,5% kvantil. Výsledné referenční rozmezí pro agregaci destiček u trombocytárních přípravků TAD jsme tak stanovili v intervalu 98,50 – 141,11 U.

Dále jsme stanovili referenční rozmezí u trombocytů z plné krve, které byly získány od 48 dárců krve odběrem do 3,0 ml vakuet Hirudin Blood Tube for Multiplate[®] analysis (Roche) a následně proměřeny na analyzátoru Multiplate[®] (Roche, Germany). Toto referenční rozmezí je blízké tomu, které uvádí Ponschab. (Ponschab, 2015)

Naměřené hodnoty (viz příloha 9. 1) jsme vyhodnotili stejným způsobem jako u TAD. Pomocí Shapiro - Wilkova testu jsme ověřili normálové rozložení dat. Z grafu 8 je patrné, že četnost výskytu naměřených hodnot je největší v intervalu 120-130 U a téměř stejná četnost se nachází i v intervalu 100-110 U. Rozložení sloupců se proto mírně vychyluje od rozložení Gaussovy křivky. Výpočtem testové statistiky w , jejíž hodnota nám vyšla $w = 0,93485$ jsme ověřili normálové rozložení dat.

Normalita dat byla dále ověřena grafickým znázorněním pravděpodobnostního QQ grafu (Graf 9) a pomocí grafu empirické distribuční funkce (Graf 10). Z grafu 9 lze vyčíst, že hodnota 100 a hodnoty v intervalu 140-160 vybočují od lineární přímky

a představují odlehle hodnoty, které jsou oproti většině hodnot abnormální. Odlehle hodnoty jsou viditelné také na grafu 10, kde se empirická distribuční funkce přibližuje 95% hornímu pásu spolehlivosti.

Ověřením normality dat, bylo následně stanoveno referenční rozmezí vypočtením hodnot distribuční statistiky (Tabulka 4) a dosazením hodnot průměr ($x = 117,42$ U) a směrodatná odchylka ($SD = 12,51$) do vzorce $x \pm 1,96$ s. Výsledné referenční rozmezí pro agregaci destiček u trombocytů z plné krve jsme tak stanovili v intervalu 92,90 – 141,93 U.

Námi stanovené referenční rozmezí se liší o ± 10 jednotek na každé straně oproti rozmezí udávané výrobcem, který uvádí rozmezí TRAPtestu v plné krvi 84-128 U. (Roche, 2013) Tato odlišnost může být způsobena vyšetřením menšího počtu souboru jedinců oproti vyšetřenému souboru výrobcem. Výsledky mohly být zároveň ovlivněny během preanalytické části vyšetření, jako je užívání přípravků bylinné medicíny pacientem, odběr vzorku nebo transport vzorku do laboratoře. Preanalytické vlivy jsme během měření nemohli ovlivnit.

Tabulka 6 Porovnání referenčního rozmezí TRAPtestu u trombocytů v plné krvi

TRAPtest	ÚVN hodnoty	Roche hodnoty
vyšetřovaný soubor	n = 48	n = 53
medián [U]	114,50	106
referenční rozmezí [U]	92,90 – 141,93	84 – 128

Výsledky agregace krevních destiček u tromboytárních transfuzních přípravků a u vzorků plné krve jsme statisticky porovnali použitím párového studentova t-testu s $p < 0,05$ při dvoustranném intervalu spolehlivosti.

Použitím tohoto testu bylo možné porovnat, která z metod stanovení agregace krevních destiček je přesnější a vhodnější při aplikaci v klinické laboratoři na základě vyhodnocení statistické významnosti rozdílů obou metod. Pro zamítnutí nebo nezamítnutí nulové hypotézy, tzn. zda se od sebe výsledky jednotlivých metod zásadně liší či nikoliv, je rozhodující hodnota p , která určuje minimální hladinu významnosti. V našem případě vyšla hodnota $p = 0,33$ (viz. Tabulka 5). Protože je výsledná hodnota $p > 0,05$, lze tvrdit, že pro stanovení agregace krevních destiček jsou vhodné oba typy vyšetřovaného

materiálu stejně. Vyhodnocením t-testu nebyl zjištěný signifikantní rozdíl mezi metodou stanovení agregace krevních destiček u transfuzních trombocytárních přípravků a u trombocytů z plné krve parametru TRAP. Výsledky odpovídají studii publikované (Windeløv, 2014).

Z hlediska provedení jednotlivých metod se přikláníme k metodě stanovení agregace krevních destiček pomocí trombocytárních transfuzních přípravků jako k výhodnější. Pro stanovení nejsou zapotřebí speciální zkumavky s hirudinem jako u vyšetření z plné krve. Tím pádem není vzorek tak náchylný k poškození, například sražením apod.

Pro grafické znázornění t-testu byl vybrán způsob využívající tzv. boxploty, neboli krabicové grafy (viz. Graf 11), které umožňují snadné porovnání dvou výsledků. Z grafu lze vyčíst průměrné hodnoty pro jednotlivé metody a jejich horní a dolní referenční mez, která je dána vztahem $x \pm 1,96 s$. Výsledné boxploty jsou až na drobné výchyly téměř identické, to vypovídá o minimálním rozdílu dosažených výsledků u obou metod srov. viz. (Solomon, 2011).

Na základě těchto výsledků, lze analyzátor Multiplate[®] (Roche, Germany) doporučit ke stanovení agregace krevních destiček nejen u vzorků plné krve, ale také u vzorků TAD. Používání analyzátoru Multiplate[®] by se kromě vyšetření funkčních defektů krevních destiček a monitorování antiagregační léčby u vzorků z plné krve dalo uplatnit také v klinických laboratořích transfuziologie pro kontrolu kvality funkce destiček trombocytárních transfuzních přípravků. (Schimmer, 2013) Po vyšetření těchto přípravků by bylo možné případné vyřazení vzorků se sníženou funkcí agregace destiček. Podání těchto přípravků představuje nemalé riziko pro pacienty a značné finanční náklady pro zdravotnické zařízení.

V další části jsme na analyzátoru Multiplate[®] (Roche, Germany) proměřili vzorky rozmrazených kryokonzervovaných trombocytárních přípravků v parametru TRAP. Protože všechny získané výsledky měření celkové aktivity destiček byly téměř nulové (viz. Graf 1), provedli jsme ředění vzorků a měření opakovali. I přes úpravu postupu změnou ředění vzorků jsme nedosáhli očekávaných výsledků.

Velmi nízké až nulové hodnoty celkové aktivity destiček mohou být známkou poškození destiček a ztráty funkce agregace, které vznikly během kryokonzervace. Při kryokonzervaci dochází ke vzniku mikrokrystalků, které mohou poškodit buňky a následně znemožnit jejich přežití při rekonstituci. K potlačení vzniku mikrokrystalků

a zabránění poškození buněk se používají tzv. kryoprotektiva, které mají nižší bod tuhnutí. Kryoprotektiva nahrazují vnitrobuněčnou vodu a zamezují vzniku mikrokrystalků a zároveň udržují stálé pH prostředí. (Šebek, 2014) V našem případě byl jako kryoprotektivum použit DMSO, který má schopnost inhibovat aktivace destiček. Jeho nevýhodou jsou možné toxické účinky.

Pro kontrolu funkce krevních destiček u TADK jsme požádali Klinikou infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN o proměření vzorků TADK metodou průtokové cytometrie. Průtokovou cytometrii lze použít například k měření aktivace destiček či produkce trombocytárních mikropartikulí.

Na průtokovém cytometru BD Canto II (Beckman) byly stanoveny monoklonální protilátky krevních destiček (viz. Graf 2, 3 a 4). Trombocytární marker CD41 je významný při shlukování krevních destiček. Z grafu 2, znázorňující výskyt protilátek CD41 u trombocytů z plné krve a kryotrombocytů, je patrné, že u kryotrombocytů byly naměřeny nižší hodnoty protilátek CD41 než u trombocytů z plné krve, což svědčí o lehce snížené schopnosti agregace destiček u kryotrombocytů. Rozdíl naměřených protilátek CD41 není ale nijak zásadní. Obě získané křivky vypovídají o normální schopnosti shlukování krevních destiček.

Na grafu 3 je znázorněno porovnání protilátek CD62, které slouží pro ověření aktivace destiček. Výsledné křivky stanovení protilátek destiček jsou identické a překrývají se, to vypovídá o stejné schopnosti aktivace destiček z plné krve a z kryokonzervantů.

Podobné výsledky lze pozorovat u stanovení destičkového markeru CD63, který stejně jako marker CD62 vypovídá o schopnosti aktivity destiček. Na Grafu 4 jsou znázorněny křivky protilátek CD63 u trombocytů z plné krve a kryotrombocytů. Obě tyto křivky se vzájemně překrývají a potvrzují tak schopnost aktivace destiček u obou vzorků. Naše výsledky odpovídají review. (Paniccia, 2015)

Detekcí monoklonálních protilátek trombocytů pomocí průtokové cytometrie jsme ověřili správnou funkci krevních destiček u kryokonzervovaných trombocytárních přípravků. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že nízká aktivita destiček naměřená na analyzátoru Multiplate® (Roche, Germany) u kryotrombocytů nebyla způsobena poškozením destiček a ztrátou jejich funkce vlivem kryokonzervace a následné rekonstituce.

Stanovení funkce destiček u trombocytárních kryokonzervovaných přípravků po rozmrazení pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate® (Roche, Germany) je prozatím ve výzkumné fázi. Další postupy pro získání validních výsledků stanovení funkce destiček je v řešení a kompetenci OHKT ÚVN v Praze.

7 Závěr

V bakalářské práci jsme zjistili, že trombocytární transfuzní přípravky jsou pro stanovení funkce krevních destiček pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate[®] (Roche, Germany) stejně vhodné jako vzorky plné krve, pro jejichž analýzu je přístroj primárně určen. Dle statistických výpočtů nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi měřením TAD a trombocytů z plné krve v parametru TRAP.

Z naměřených hodnot bylo stanoveno referenční rozmezí pro obě metody měření agregace destiček. Každé zavedení nové metody v laboratoři vyžaduje stanovení vlastních referenčních rozmezí, která se v ideálním případě shodují s referenčním rozmezím udávaným výrobcem.

Analýzou kryokonzervovaných trombocytárních přípravků na analyzátoru Multiplate[®] (Roche, Germany) jsme nedosáhli očekávaných výsledků. Funkčnost destiček byla proto poté ověřena stanovením monoklonálních protilátek metodou průtokové cytometrie. Stanovení funkce TADK na analyzátoru Multiplate[®] (Roche, Germany) je i nadále předmětem výzkumu OHKT ÚVN v Praze, který je prozatím v testovací fázi výzkumu.

Tato práce potvrdila možnost využití analyzátoru Multiplate[®] (Roche, Germany), pracujícím na principu impedanční agregometrie, ke stanovení funkce destiček u trombocytárních transfuzních přípravků. Lze jej tedy pro tyto účely doporučit v klinických laboratořích a nemocničních zařízeních.

8 Seznam použitých zkratk a symbolů

ACC	akcelerace
ADP	adenosindifosfát
AGG	agregace
APC	antigen prezentující buňka
ASA	acetylsalicylová kyselina
ASPI	arachidonová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
AU	agregační jednotky (Aggregation Units)
AUC	plocha pod křivkou
Ca	vápník
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	Cluster Designation, CD molekuly
CFU	progenitorová buňka erytrocytů a megakaryocytů (colony-forming-unit)
CFU-GEMM	progenitorová buňka (granulocyte-erythroid-megakaryocyte-makrophage)
COL	kolagen
COX	cyklooxygenáza
CV	variační koeficient
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
DTS	denzní tubulární systém
FGF	růstový faktor fibroblastů (fibroblast-growth-faktor)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G-CSF	faktor stimulující růst granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů
GP IIb/IIIa	glykoproteinový komplex IIb/IIIa
GP	glykoprotein
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin

LF	Lékařská fakulta
MEA	Multiplate Electrode Aggregometry
P2Y ₁ a P2Y ₁₂	destičkové membránové receptory pro adenosindifosfát
NaCl	chlorid sodný
NF-E2	transkripční faktor (nuclear factor erythroid-derived 2)
OHKT	Oddělení hematologie a krevní transfuze
OKS	otevřený kanálkový systém
PAF	faktor aktivující destičky
PBS	fosfátový pufr
PE	phycoerythrin
QQ	kvantilově-kvantilový graf
RISTO	ristocetin
RGD	arginin-glycin-kyselina asparagová
SD	směrodatná odchylka
TAD	trombocyty z aferézy deleukotizované
TADK	trombocyty z aferézy deleukotizované kryokonzervované
THB	pufr Tyrode`s/HEPES buffer
TPO	trombopoetin
TRAP	peptid aktivující trombinový receptor
TU	transfuzní jednotka
TxA ₂	tromboxan A ₂
UK	Univerzita Karlova
ÚVN	Ústřední vojenská nemocnice
VEL	velocity
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice
vWF	von Willebrandův faktor

9 Seznam použité literatury

- 1) ABP LTD, . 2011. *Arachidonová kyselina reagent*. Praha. Dostupné také z:
<http://diagnostica.cz/wp-content/uploads/2014/07/ARA+CZ.pdf>
- 2) BHATT, Deepak. 2008. *Platelets in cardiovascular disease*. London: Imperial College Press, xv, 218 p. ISBN 978-1860948268.
- 3) BULTAS, J. a D. KARETOVÁ 2010. Noví hráči na šachovnici protidestickové léčby - co můžeme očekávat?. *Kardiologická revue* [online]. 12(1), 38-45 [cit. 2016-03-07]. ISSN 1801-8653. Dostupné z:
http://www.kardiologickarevue.cz/pdf/kr_10_01_08.pdf
- 4) ČIHÁK, Radomír. 2016. *Anatomie 3*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, xvii, 237, xiv stran. ISBN 978-80-247-5636-3.
- 5) FAUKNEROVÁ, M., P. OSMANČÍK a M. ŠPAČEK 2011. Agregometrie v sekundární prevenci cévních mozkových příhod. Aspirinová rezistence. *Česká a slovenská Neurologie a Neurochirurgie* [online]. Brno: Ambit Media, 74107(5), 527-532 [cit. 2016-03-07]. ISSN 1802-4041.
- 6) GAWAZ, Meinrad. 2001. *Blood platelets*. 1. Germany: Thieme Medical Publishers. ISBN 3-13-105811-0.
- 7) GRESELE, Paolo (ed.), Clive PAGE (ed.), Valentin FUSTER (ed.) a Jos VERMYLEN (ed.). 2002. *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders pathophysiology, pharmacology and therapeutics*. Cambridge, U.K: Cambridge University Press. ISBN 978-051-1057-205.
- 8) HEIDEKEROVÁ, Monika. 2009. *Význam průtokové cytometrie v hematoonkologické diagnostice*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.
- 9) HOFFMANN-LA ROCHE LTD., H. 2013-2015. *Multiplate® analyzer: Stručná příručka*. Germany: Roche Diagnostics GmbH.

- 10) HYPHEN BIOMED, . 2014. *Epinephrine pro agregační testy*. Praha. Dostupné také z: <http://www.diagnostica.cz/wp-content/uploads/2014/11/AG002K-Epinephrine-20140626.pdf>
- 11) CHANG, Y., D. BLUTEAU, N. DEBILI a W. VAINCHENKER 2007. From hematopoietic stem cells to platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5(1), 318-327. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02472.x. ISSN 15387933. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2007.02472.x>
- 12) INDRÁK, Karel a Štefan ALUŠÍK (ed.), Magdaléna LEJSKOVÁ (ed.). 2006. *Hematologie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 278 s., [9] s. barev. obr. příl. Postgraduální klinický projekt. ISBN 80-725-4868-9.
- 13) JACKSON, S. 2007. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 109(12), 5087-5095. DOI: 10.1182/blood-2006-12-027698. ISSN 0006-4971. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-12-027698>
- 14) JOBLING, Louise a Lorna EYRE. 2013. Haemostasis, blood platelets and coagulation. *Anaesthesia*. 14(2), 51-53. DOI: 10.1016/j.mpaic.2012.12.001. ISSN 14720299. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472029912002871>
- 15) KUBISZ, Peter. 1987. *Trombocyty a trombocytopatie*. 1. Martin: Osveta. ISBN 70-033-87.
- 16) LAŇKOVÁ, Jaroslava a Jaroslav MALÝ. 2013. *Antitrombotická prevence a léčba v primární péči: doporučený postup pro všeobecné praktické lékaře : novelizace 2013* [online]. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 18 s. [cit. 2016-03-16]. ISBN 978-80-86998-62-6. Dostupné z: http://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy-od-2013/DP_antitrombot_prevence_a_lecba.pdf
- 17) LEXOVÁ, Stanislava. 2000. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 183 s. ISBN 80-701-3304-X.

- 18) LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. 2012. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Překlad Maxmilián Wenke. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Grada, xiv, 366 s. ISBN 978-80-247-3908-3.
- 19) MACHLUS, Kellie a Joseph ITALIANO 2013. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of Cell Biology*. 201(6), 785-796. DOI: 10.1083/jcb.201304054. ISSN 0021-9525. Dostupné také z: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201304054>
- 20) MALARA, Alessandro a Alessandra BALDUINI. 2012. Blood platelet production and morphology. *Thrombosis Research*. 3(129), 241-244. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.042. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811006384>
- 21) MALÝ, J. 2005. Protidestičková léčba. *Vnitřní lékařství* [online]. Brno: Medical Publishing and Consulting, 51(78), 826-832 [cit. 2016-03-17]. ISSN 1801-7592. Dostupné z: http://kramerius.medvik.cz/search/nimg/IMG_FULL/uuid:98e2d36b-0615-11e5-b183-d485646517a0#page=1
- 22) MALÝ, J. 2005. Vyšetření aktivity destičkových funkcí se vztahem k rezistenci na kyselinu acetylsalicylovou. *Vnitřní lékařství* [online]. Brno: Medical Publishing and Consulting, 51(2), 157-162 [cit. 2016-03-17]. ISSN 1801-7592. Dostupné z: http://kramerius.medvik.cz/search/nimg/IMG_FULL/uuid:974b1c61-0615-11e5-b183-d485646517a0#page=1
- 23) MALÝ, M., I. MARINOV a M. ORAVEC 2010. Co musí vědět intervenční kardiolog o krevních destičkách. *Kardiologická revue* [online]. Praha: Ambit Media, 12(3), 134-137 [cit. 2016-05-09]. ISSN 1801-8653.
- 24) MALÝ, Martin. 2003. Antiagregační léčba blokátory adenosindifosfátového receptoru. *Remedia* [online]. (2), 110-115 [cit. 2016-03-07]. ISSN 2336-3541. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2003/2-2003/Antiagregacni-lecba-blokatory-adenosindifosfatoveho-receptoru/e-91-9y-df.magarticle.aspx>

- 25) MARINOV, I., A. LUXOVÁ a V. TKÁČOVÁ 2011. Standardizované postupy pro analýzu krevních destiček metodou průtokové cytometrie ve vztahu k riziku trombózy a krvácení. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. Česká lékařská společnost J.E. Purkyně, 19(40), 9-14 [cit. 2016-04-29]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/Marinov.pdf>
- 26) MATÝŠKOVÁ, Miloslava a Ingrid HRACHOVINOVÁ. 1999. *Hematologie pro zdravotní laboranty: Krevní srážení*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 203 s. ISBN 80-701-3278-7.
- 27) MENKIS, Alan H., Janet MARTIN, Davy C.H. CHENG et al.. 2012. Drug, Devices, Technologies, and Techniques for Blood Management in Minimally Invasive and Conventional Cardiothoracic Surgery. *Innovations: Technology and Techniques in Cardiothoracic and Vascular Surgery* [online]. 7(4), 229-241 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1097/IMI.0b013e3182747699. ISSN 1556-9845. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- 28) NIESWANDT, B., I. PLEINES a M. BENDER 2011. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 9(1), 92-104. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x. ISSN 15387933. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x>
- 29) NOSÁL, Radomír a Viera JANČINOVÁ. 1990. *Krvné doštičky v biológii a medicíne*. 1. Bratislava: VEDA. ISBN 80-224-0124-2.
- 30) PANICCIA, R.. 2009. Assessment of Platelet Function on Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry in High-Risk Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapy. *American Journal of Clinical Pathology*. 131(6), 834-842. DOI: 10.1309/AJCPTE3K1SGAPOIZ. ISSN 0002-9173. Dostupné také z: <http://ajcp.ascpjournals.org/cgi/doi/10.1309/AJCPTE3K1SGAPOIZ>

- 31) PANICCIA, Rita, Raffaella PRIORA, Agatina ALESSANDRELLO LIOTTA a Rosanna ABBATE. 2015. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular Health and Risk Management* [online]. (11), 133-148 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.2147/VHRM.S44469. ISSN 1178-2048. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/platelet-function-tests-a-comparative-review-peer-reviewed-article-VHRM>
- 32) PATEL, S. 2005. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *Journal of Clinical Investigation*. 115(12), 3348-3354. DOI: 10.1172/JCI26891. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI26891>
- 33) PECKA, Miroslav. 2002. *Laboratorní hematologie v přehledu, Buňka a krvetvorba*. Český Těšín: tiskárna FINIDR, s. r. o., s. 58 - 64.
- 34) PECKA, Miroslav. 2002. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. 1. Český Těšín: Finidr, 160 s. ISBN 80-866-8201-3.
- 35) PECKA, Miroslav. 2004. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy*. 1. Český Těšín: FINIDR. ISBN 80-86682-03-X.
- 36) PECKA, Miroslav. 2006. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. 1. Český Těšín: FINIDR, 304 s. ISBN 80-86682-02-1.
- 37) PENKA, M. a J. GUMULEC 2004. Principy antitrombotické léčby. *Kardiologická revue* [online]. (4), 142-150 [cit. 2016-03-16]. ISSN 2336-2898. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=kr_04_04_05.pdf
- 38) PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. 2011. *Hematologie a transfúzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 421 s., 30, 8, 23 s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3459-0.
- 39) PETRICEVIC, M., S. KONOSIC, B. BIOCINA et al. 2016. Bleeding risk assessment in patients undergoing elective cardiac surgery using ROTEM® platelet and Multiplate® impedance aggregometry. *Anaesthesia* [online]. , 636-647 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1111/anae.13303. ISSN 00032409. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/anae.13303>

- 40) PONSCHAB, Martin, Christoph J. SCHLIMP, Johannes ZIPPERLE et al.. 2015. Platelet function in reconstituted whole blood variants. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* [online]. 79(5), 797-804 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1097/TA.0000000000000852. ISSN 2163-0755. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- 41) POUL, Hynek. 2012. Protidestičková terapie. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 26(2), 79-82 [cit. 2016-03-16]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/02/06.pdf>
- 42) RACEK, Jaroslav. 2006. *Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd.* Praha: Galén, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.
- 43) RAHE-MAYER, N., C. FROEMKE a S. PIEPENBROCK 2009. Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery and platelet function assessment by multiple electrode aggregometry. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* [online]. 53(2), 168-175 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1111/j.1399-6576.2008.01845.x. ISSN 00015172. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-6576.2008.01845.x>
- 44) ROCHE DIAGNOSTICS, . 2012. *RISTOtest*. Mannheim. Dostupné také z: [https://pim-eservices-tst.roche.com/eLD/\(S\(beit3at3ux5gizgmryjguwww\)\)/lv/ru/Documents/GetDocument?documentId=9c028748-e3a3-e311-a887-00215a9b0bb8](https://pim-eservices-tst.roche.com/eLD/(S(beit3at3ux5gizgmryjguwww))/lv/ru/Documents/GetDocument?documentId=9c028748-e3a3-e311-a887-00215a9b0bb8)
- 45) ROCHE, . 2013. *Reference Ranges for Multiplate® analysis*. 1. Switzerland. Dostupné také z: http://www.roche.es/content/dam/roche_spain/es_ES/documents/Multiplate_Reference_ranges.pdf
- 46) ROCHE. 2015. Multiplate® analyzer. *Cobas* [online]. Roche Diagnostics Limited [cit. 2016-04-23]. Dostupné z: <http://www.cobas.com/home/product/hemostasis-testing/multiplate-analyzer.html>

- 47) RUGGERI, Zaverio 2009. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation*. 16(1), 58-83. DOI: 10.1080/10739680802651477. ISSN 1073-9688. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1080/10739680802651477>
- 48) SCHIMMER, Christoph, Khaled HAMOUDA, Sebastian SOMMER, Mehmet ÖZKUR, Johannes HAIN a Rainer LEYH. 2013. The Predictive Value of Multiple Electrode Platelet Aggregometry (Multiplate) in Adult Cardiac Surgery. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon* [online]. 61(08), 733-743 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1055/s-0033-1333659. ISSN 0171-6425. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1333659>
- 49) SOLOMON, C., S. TRANTINGER, B. ZIEGLER, A. HANKE, N. RAHEMEYER, W. VOELCKEL a H. SCHÖCHL 2011. Platelet function following trauma. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. 106(2), 322-330 [cit. 2016-05-09]. DOI: 10.1160/TH11-03-0175. ISSN 0340-6245. Dostupné z: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214>
- 50) ŠEBEK, Jaroslav. 2014. Kryobiologie: Kryoprezervace a viabilita buněk. In *in vitro diagnostika*. Praha: Beckman Coulter Česká republika s.r.o., (25), 17-19.
- 51) TROJAN, Stanislav. 2003. *Lékařská fyziologie*. 4. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 117. DOI: 80-247-0512-5.
- 52) TROJAN, Stanislav. 2003. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 771 s. ISBN 80-247-0512-5.
- 53) VANHOORELBEKE, Karen a Hans DECKMYN. 2012. Blood platelet biochemistry. *Thrombosis Research*. 129(3), 245-249. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.002. ISSN 00493848. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384811005780>
- 54) VOJÁČEK, Jan a Martin MALÝ. 2004. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 276 s. ISBN 80-247-0501-X.

55) WINDELØV, Nis A. et al. 2014. Platelet aggregation following trauma. *Blood Coagulation* [online]. 25(1), 67-73 [cit. 2016-05-07]. DOI: 10.1097/MBC.0b013e328364c2da. ISSN 0957-5235. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>

9.1 Internetové zdroje

URL1

Biology of Humans: Composition of Blood [online]. In: [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://schoolbag.info/biology/humans/14.html>

URL2

Haematopoiesis: Locations. 2011. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis#/media/File:Hematopoesis_EN.svg

URL3

Coronary artery disease. 2012. In: *University of Maryland Medical Center* [online]. [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: http://umm.edu/health/medical/reports/articles/~/_/media/ADAM/Images/en/19194.ashx

URL4

Multiplate® TRAPtest. 2015. *Cobas* [online]. Roche Diagnostics Limited [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.cobas.com/home/product/hemostasis-testing/trap-test.html>

10 Seznam obrázků

Obr. 1 Složení krve po centrifugaci	3
Obr. 2 Procentuální zastoupení krvetvorných orgánů v prenatálním a postnatálním období	5
Obr. 3 Struktura cévní stěny	7
Obr. 4 Schématický nákres krevní destičky v klidovém stavu	12
Obr. 5 Schématický nákres krevní destičky v aktivovaném stavu.....	12
Obr. 6 Schéma adheze, aktivace a agregace krevních destiček	16
Obr. 7 Inhibitory agregace krevních destiček	20
Obr. 8 Multiplate [®] analyzátor	23
Obr. 9 Přichycení aktivovaných destiček na povrch elektrod.....	24
Obr. 10 Parametry analyzátoru Multiplate.....	24

11 Seznam grafů

Graf 1 Celková aktivita destiček TRAPtestu u TADK - vzorek 1,2.....	32
Graf 2 Porovnání protilátek CD41 u trombocytů z plné krve a kryotrombocytů	33
Graf 3 Porovnání protilátek CD62 u trombocytů z plné krve a kryotrombocytů	33
Graf 4 Porovnání protilátek CD63 u trombocytů z plné krve a kryotrombocytů	34
Graf 5 Normálové rozložení dat TRAPtestu u TAD pomocí histogramu	35
Graf 6 Normálové rozložení dat TRAPtestu u TAD pomocí pravděpodobnostního QQ grafu	36
Graf 7 Normálové rozložení dat TRAPtestu u TAD pomocí distribuční funkce	36
Graf 8 Normálové rozložení dat TRAPtestu u trombocytů z plné krve	37
Graf 9 Normálové rozložení dat TRAPtestu u trombocytů z plné krve pomocí pravděpodobnostního QQ grafu.....	38
Graf 10 Normálové rozložení dat TRAPtestu u trombocytů z plné krve pomocí distribuční funkce	38
Graf 11 Porovnání TRAPtestu u TAD a trombocytů z plné krve.....	39

12 Seznam tabulek

Tabulka 1 Pipetovací postup	29
Tabulka 2 Pipetovací postup TAD/TADK.....	29
Tabulka 3 Deskriptivní statistika hodnot TRAPtestu u TAD.....	35
Tabulka 4 Deskriptivní statistika hodnot TRAPtestu u trombocytů z plné krve.....	37
Tabulka 5 Porovnání TRAPtestu u TAD a trombocytů z plné krve.....	39
Tabulka 6 Porovnání referenčního rozmezí TRAPtestu u trombocytů v plné krvi.....	42

13 Přílohy

13.1 Naměřené hodnoty dárců

Trombocyty z plné krve		Trombocyty z TAD	
Dárce	TRAPtest [U]	Dárce	TRAPtest [U]
1	123	1	114
2	131	2	99
3	102	3	117
4	106	4	120
5	118	5	119
6	108	6	102
7	110	7	118
8	104	8	139
9	108	9	114
10	129	10	118
11	130	11	142
12	111	12	117
13	109	13	130
14	102	14	106
15	158	15	128
16	113	16	136
17	100	17	118
18	109	18	126
19	107	19	128
20	102	20	107
21	112	21	141
22	122	22	124
23	107	23	120
24	112	24	120
25	125	25	114
26	125	26	120
27	114	27	104
28	129	28	97
29	147	29	131
30	112	30	124
31	107	31	118
32	100	32	105
33	127	33	127
34	123	34	107
35	124	35	120
36	127	36	136
37	100	37	111

Trombocyty z plné krve		Trombocyty z TAD	
Dárce	TRAPtest [U]	Dárce	TRAPtest [U]
38	115	38	138
39	119	39	115
40	107	40	118
41	120	41	127
42	113	42	112
43	129	43	124
44	132	44	125
45	137	45	117
46	126	46	118
47	122	-	-
48	123	-	-