

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Anti-hemostatické účinky serpinů z klíštěte
Ixodes ricinus

Bakalářská práce

Monika Ederová

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2020

Ederová, M., 2020: Anti-hemostatické účinky serpinů z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Antihemostatic effects of serpins from the tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech.] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Antihemostatic effects of four recombinantly produced serpins of the tick *Ixodes ricinus* (IRS 2, IRS 3, IRS 5 and IRS 8) were tested using a method of flow cytometry. Fluorescently labeled antibodies against platelet surface molecules were used to determine the difference in platelet aggregation and activation after incubation of samples with specific serpin.

To see how serpins affect coagulation pathway, the prothrombin time, activated partial thromboplastin time and thrombin time tests were performed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 6. 5. 2020

.....

podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, cenné rady, trpělivost a ochotu pomoci s jakýmkoliv problémem, ať už během práce v laboratoři či při zpracování této práce.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Hemostáza.....	1
1.2. Krevní destičky (trombocyty).....	1
1.2.1. Aktivace a agregace krevních destiček	2
1.2.1.1. Povrchové znaky (markery) aktivace krevních destiček.....	4
1.2.1.2. Agregometrie v praxi.....	5
1.3. Hemokoagulace	6
1.3.1. Koagulační testy.....	7
1.3.1.1. Protrombinový čas (PT)	7
1.3.1.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)	7
1.3.1.3. Trombinový čas (TT)	8
1.4. Serpiny	8
2. Cíle práce	12
3. Materiál a metody	13
3.1. Použité roztoky, protilátky, aktivátory a inhibitory	13
3.2. Příprava vzorků pro testy aktivace a agregace krevních destiček	15
3.2.1. Odběr krve.....	16
3.2.2. Příprava PRP (Platelet Rich Plasma)	16
3.2.3. Ředění PRP	16
3.2.4. Počítání destiček	16
3.2.5. Další zpracování vzorku.....	17
3.2.5.1. Agregace.....	18
3.2.5.2. Aktivace.....	19
3.2.6. Inhibitory.....	20
3.2.7. Analýza výsledků	20
3.3. Koagulační testy	22
3.3.1. Protrombinový čas (PT)	23
3.3.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)	23
3.3.3. Trombinový čas (TT)	24
3.3.4. Analýza výsledků	24

4. Výsledky	25
4.1. Agregace destiček	25
4.2. Aktivace destiček	31
4.2.1. Testování aktivátorů	31
4.2.2. Testování inhibice aktivace destiček	32
4.3. Koagulační testy	36
4.3.1. Protrombinový čas (PT)	36
4.3.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)	37
4.3.3. Trombinový čas (TT)	39
5. Diskuze	40
6. Závěr	42
7. Seznam citované literatury	43

1. Úvod

1.1. Hemostáza

Hemostáza, jakožto proces zástavy krvácení, je nepostradatelným fyziologickým mechanismem organismu, který můžeme z časového hlediska rozdělit na čtyři kroky (Kittnar and kol., 2011):

- vazokonstrikce
- aktivace a agregace trombocytů
- hemokoagulace
- fibrinolýza

Po poškození cévy dochází nejdříve k jejímu stažení, čímž se minimalizuje krevní průtok poškozenou oblastí a tím i krevní ztráty. Následuje tvorba primární hemostatické zátky tvořené agregovanými destičkami, která je poté v procesu hemokoagulace nahrazena definitivním trombem tvořeným fibrinovou sítí, ve které jsou zachytávány krevní elementy (trombocyty, bílé i červené krvinky). Jakmile krevní sraženina splní svou úlohu, musí být z těla odstraněna, tudíž v procesu fibrinolýzy dochází k jejímu rozpuštění (Kittnar and kol., 2011).

1.2. Krevní destičky (trombocyty)

Trombocyty jsou krevní elementy, které mají v klidovém stavu diskoidní tvar (Kamath, Blann and Lip, 2001). Nejedná se o buňky v pravém slova smyslu, jelikož vznikají jako odštěpky cytoplazmy megakaryocytů (George, 2000), nemají tedy jádro, nemohou se replikovat (Kittnar and kol., 2011) a průměrně přežívají 8-10 dní (Kamath, Blann and Lip, 2001). V krvi člověka se fyziologicky vyskytují v koncentraci $150-350 \times 10^9/l$ (George, 2000).

Hlavní úlohou krevních destiček je tvorba primární krevní sraženiny tvořené agregáty destiček. Mimo to se ale účastní i imunitní odpovědi a zánětlivých reakcí, kdy se shlukují v místě poškození a uvolňují cytokiny a chemokiny, které mají chemotaktické účinky na neutrofile a monocyty. Napomáhají tak navádění imunitních buněk do místa zánětu, zároveň ale samy fungují jako imunitní buňky pohlcující mikroby (Sonmez a Sonmez, 2017).

Pro fyziologickou funkci trombocytů jsou stěžejní vlastnosti jejich plazmatické membrány, na jejímž povrchu se nachází glykoproteiny, které se účastní adheze a agregace destiček, čímž se významně podílí na procesu hemostázy a trombogeneze (Kieffer and Phillips, 1990; Kamath, Blann and Lip, 2001).

Systém kontraktilních filament obsažených v cytoplazmě krevních destiček pomáhá udržovat jejich diskoidní tvar, zároveň ale umožňuje zásadní změnu jejich tvaru v průběhu aktivace a agregace (George, 2000; Kamath, Blann and Lip, 2001).

V cytoplazmě krevních destiček se dále nachází různé typy granul (George, 2000; Kamath, Blann and Lip, 2001; Kittnar and kol., 2011):

- α -granula – obsahují hlavně proteiny (destičkový faktor 4 (antagonista heparinu), destičkový růstový faktor (PDGF), β -tromboglobulin, fibrinogen, von Willebrandův faktor, fibronektin a další srážecí faktory)
- denzní granula – obsahují především vápenaté ionty, ADP, ATP a serotonin
- lysozomy – obsahují hydrolytické enzymy
- peroxizomy – obsahují enzym katalázu

Uvolněním těchto faktorů během trombocytární aktivace dochází k aktivaci dalších destiček a amplifikaci jejich agregace (Kittnar and kol., 2011).

1.2.1. Aktivace a agregace krevních destiček

Kvůli své schopnosti rychle se aktivovat v místě poškození cévní stěny, jsou trombocyty významnými účastníky tvorby krevního trombu (Offermanns, 2006). Při poškození endoteliální výstelky cévy dochází k odhalení kolagenních vláken, které způsobí aktivaci trombocytů (Ruggeri, 2002; Jackson, Nesbitt and Kulkarni, 2003). Tato aktivace vyvolá výraznou změnu tvaru krevních destiček, které vysílají na povrch drobné výchlípky cytoplazmy (George, 2000), čímž nabývají hvězdičkovitého vzhledu, zároveň ale dochází i k jejich degranulaci (viz Obr. 1).

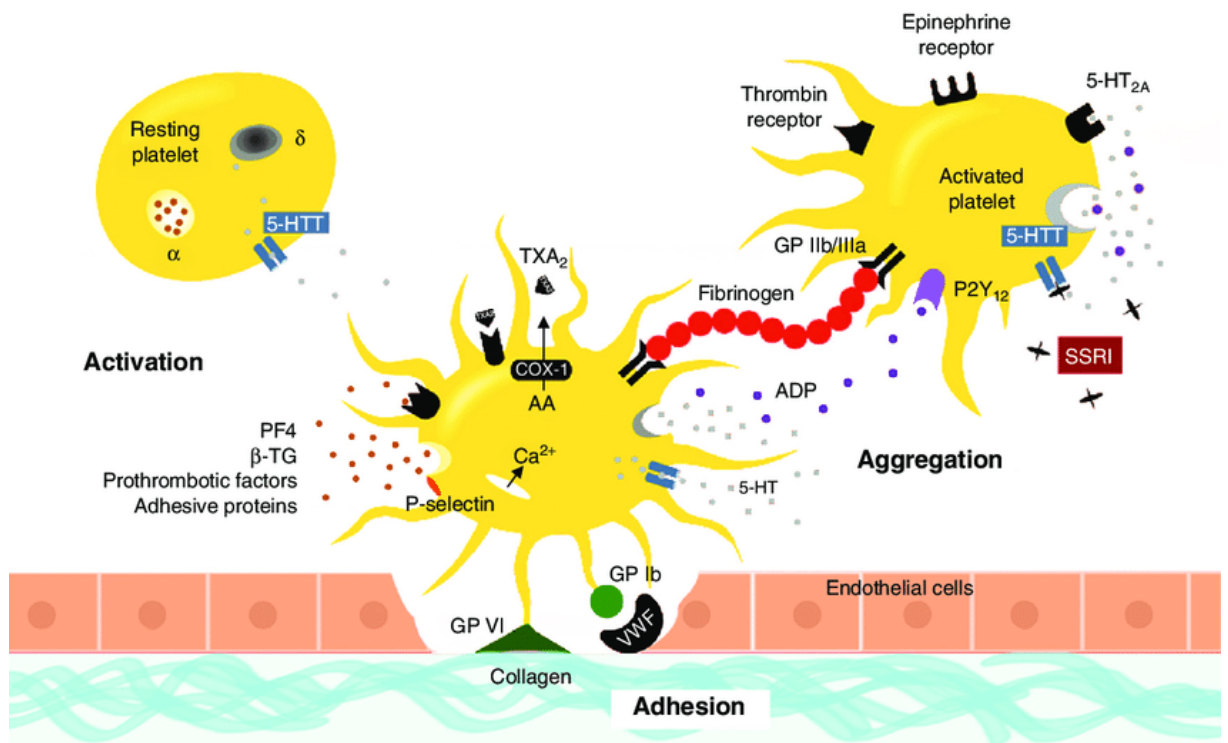
Během degranulace krevních destiček se z granul uvolňuje řada faktorů spouštějících další hemostatické procesy (Sonmez a Sonmez, 2017), dochází k zesílení vzájemných interakcí aktivovaných destiček i jejich interakcí s dalšími krevními buňkami a vaskulárními endoteliálními buňkami (Nishibori a kol., 1993).

Aktivované destičky adherují k poškozené cévní stěně, kdy počáteční interakci mezi povrchem krevních destiček a kolagenními vlákny zajišťuje destičkový receptor pro von Willebrandův faktor GPIb/V/IX a kolagenní receptor GPVI (Jackson, Nesbitt and Kulkarni, 2003; Nieswandt and Watson, 2003; Ruggeri, 2003; Offermanns, 2006). Aktivace integrinů GPIIb/IIIa a GPIa/IIa na krevních destičkách vede k pevnému spojení mezi trombocyty a poškozenou cévní stěnou (Offermanns, 2006).

V další fázi dochází ke vzájemnému propojování trombocytů do podoby primární hemostatické zátky. Glykoprotein GPIIb/IIIa (integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) je u klidových trombocytů v neaktivním stavu, ale po aktivaci destiček je konvertován do aktivní konformace, ve které je schopen vázat makromolekulární ligandy jako je fibrinogen a von Willebrandův faktor, a tím navzájem zesilovat krevní destičky (Tadokoro a kol., 2003; Shattil a Newman, 2004; Bennett, 2005; Ratnikov, Partridge a Ginsberg, 2005; Offermanns, 2006).

Chemoatrakce dalších destiček se účastní řada lokálně se hromadících mediátorů, které jsou produkovány či uvolňovány během degranulace trombocytů. Tyto mediátory zahrnují ADP nebo tromboxan A₂, které jsou uvolňovány z aktivovaných destiček a fungují skrze receptory spřaženými s G proteiny, čímž spouští signalizaci, která může dále navýšit jejich produkci či uvolňování. Tato pozitivní zpětná vazba zajišťuje rychlou aktivaci trombocytů a zformování krevní sraženiny (Offermanns, 2006).

Schematické shrnutí aktivity krevních destiček během hemostázy je vyobrazeno na Obr. 1.



Obr. 1: Změny a fungování krevních destiček v procesu hemostázy (De Abajo, 2011).

Aktivace trombocytů může být prokázána pomocí granulárních membránových molekul, které se na jejich povrchu objevují až po degranulaci krevních destiček (Ruf a Patscheke, 1995; van Velzen a kol., 2012).

Takovými molekulami jsou např. CD62P, CD63 nebo CD154, které jsme využívali i my v našich experimentech.

1.2.1.1. Povrchové znaky (markery) aktivace krevních destiček

CD62P (P-selektin) je 140 kDa protein, který se u neaktivovaných trombocytů nachází v membráně α -granulí. Jakmile ale následkem aktivace destiček dochází k jejich degranulaci, P-selektin je redistribuován na povrch krevních destiček, kde ho můžeme pomocí vhodných fluorescenčně značených protilátek detekovat průtokovou cytometrií (Leytin a kol., 2000; Kamath, Blann a Lip, 2001). Právě přítomnost P-selektinu na plazmatické membráně aktivovaných destiček a jeho absence na povrchu klidových destiček tedy umožňuje pomocí této metody spolehlivě detekovat aktivaci trombocytů (Kamath, Blann a Lip, 2001; Leytin a kol., 2004; Linden a kol., 2004; Curvers a kol., 2008).

Funkcí P-selektinu je zprostředkování interakce mezi krevními destičkami a bílými krvinkami nebo endoteliálními buňkami (Furie, Furie a Flaumenhaft, 2001; Curvers a kol., 2008).

CD63 je jedním ze zástupců velké rodiny tetraspaninů (povrchových membránových proteinů se čtyřmi transmembránovými doménami), které na buněčném povrchu vytváří tzv. mikrodomény bohaté na tetraspaniny (tetraspanin-enriched microdomains; TEMs) zahrnující několik tetraspaninů a další molekuly (např. integriny nebo receptory). Tetraspaniny se podílí na procesech jako je buněčná aktivace, adheze a diferenciací (Pols and Klumperman, 2009).

CD63 kromě TEMs najdeme v bohatém zastoupení i u pozdních endozomů a lysozomů (Pols and Klumperman, 2009) a je přítomen i na membráně denzních granul (Nishibori a kol., 1993). Podobně jako u P-selektinu se jeho exprese na povrchu v důsledku degranulace zvyšuje. CD63 interaguje s různými integriny, jinými tetraspaniny, receptory na povrchu buněk, kinázami atd. (Pols and Klumperman, 2009).

CD154 (CD40 ligand) je transmembránový protein patřící do TNF (Tumor Necrosis Factor) rodiny, který se významně podílí na průběhu imunitní odpovědi, jelikož po navázání na receptor na B-lymfocytech (CD40) indukuje B-buněčnou proliferaci a tvorbu paměťových B-lymfocytů. Původně byl tento protein objeven u buněk imunitního systému, nicméně později se ukázalo, že se nachází i na endoteliálních buňkách, monocitech, makrofázích (Schönbeck a Libby, 2001; André a kol., 2002) a krevních destičkách (Henn a kol., 1998, 2001). Distribuce CD154 v trombocytech je objasněna jen částečně, každopádně se nachází v jejich α -granulích (Kamykowski a kol., 2011; Charafeddine a kol., 2012; Dewitte a kol., 2015). U klidových destiček je tedy CD154 schovaný uvnitř granul, ale po trombocytární aktivaci jeho exprese na povrchu destiček prudce roste (André a kol., 2002).

Jako marker veškerých trombocytů bývá používán **CD9** antigen, tetraspanin, který je exprimován na klidových i aktivovaných destičkách (Pols and Klumperman, 2009).

1.2.1.2. Agregometrie v praxi

Testování agregace krevních destiček nachází v klinice uplatnění v monitorování léčby trombofilních stavů, odhadu rizika krvácení během operace, diagnostice dědičných krvácivých stavů nebo v transfúzním lékařství (Koltai a kol., 2017).

Měření agregace trombocytů se může provádět pomocí optických agregometrů, které využívají PRP (platelet rich plasma) a jsou založeny na detekci změny propustnosti světla po

přidání aktivátoru k PRP (Hankey a Eikelboom, 2006; Pusch a kol., 2008; Koltai a kol., 2017).

Další možností jsou impedanční agregometry, které naopak zaznamenávají změnu (zvýšení) impedance mezi dvěma elektrodami po spuštění trombocytární agregace pomocí aktivátoru. Výhodou je, že v tomto případě lze vyšetřovat plnou krev (Cardinal a Flower, 1980; Koltai a kol., 2017).

Agregace se dá také testovat pomocí průtokové cytometrie, tromboelastografie nebo analyzářů funkce krevních destiček (Koltai a kol., 2017).

1.3. Hemokoagulace

Fyziologická hemokoagulace představuje rovnováhu mezi prokoagulačním systémem zodpovědným za tvorbu hemostatické zátky a inhibičními mechanismy. Při případných výchylkách této rovnováhy (navýšení aktivity koagulačních faktorů či snížení aktivity inhibitorů) vznikají krvácivé stavy (snížená krevní srážlivost) či trombofilní stavy (zvýšená krevní srážlivost) (Previtali a kol., 2011; Palta, Saroa a Palta, 2014).

Během koagulace dochází ke kaskádové aktivaci koagulačních faktorů, která v konečném důsledku vede k přeměně rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin (Palta, Saroa and Palta, 2014). Tak je primární hemostatická zátka tvořená agregovanými krevními destičkami nahrazena definitivním trombem.

Většina koagulačních faktorů jsou prekurzory proteolytických enzymů, které cirkulují v plazmě v neaktivním stavu a jsou produkovány játry (Kittnar and kol., 2011; Palta, Saroa and Palta, 2014).

K antikoagulačním látkám přirozeně se v těle vyskytujícím patří zejména inhibitory serinových proteáz (viz kapitola 1.4.), např. antitrombin, který vyjma trombinu inhibuje i faktory IX, X, XI a XII, nebo serinová protéza, protein C, proteolyticky inaktivující faktory V a VIII. Mezi další inhibitory trombinu se řadí heparinový kofaktor II, α 2-makroglobulin a α 1-antitrypsin (Opal a kol., 2002; Ezihe-Ejiofor a Hutchinson, 2013; Palta, Saroa a Palta, 2014).

Koagulační kaskáda je typicky dělena na vnější a vnitřní cestu, přičemž obě končí aktivací faktoru X. K aktivaci vnější cesty hemokoagulační kaskády dochází prostřednictvím tkáňového faktoru (to je soubor extravaskulárních molekul, zejména fosfolipidů a lipoproteinů), který se uvolňuje při poškození cévní stěny. U vnitřní cesty hemokoagulace je

stimulem kontakt faktoru XII s negativně nabitým povrchem, nejčastěji kolagenem (Owens and Mackman, 2010; Kittnar and kol., 2011; Palta, Saroa and Palta, 2014).

Aktivovaný faktor X spolu s faktorem V, destičkovými fosfolipidy a vápenatými ionty způsobí konverzi protrombinu na trombin, ten následně konvertuje rozpustný fibrinogen na jeho nerozpustnou formu (fibrin) (Palta, Saroa and Palta, 2014). Tvorba trombinu vede k aktivaci faktoru XIII (fibrin stabilizujícího faktoru), který kovalentně propojí fibrinové polymery a zajistí tak stabilitu vzniklé sekundární trombotické zátky (Bombeli and Spahn, 2004; Lasne, Jude and Susen, 2006).

1.3.1. Koagulační testy

Koagulační testy měří čas nutný pro tvorbu fibrinového vlákna od spuštění reakce. Koagulometry, které jsou pro tento účel využívány, mohou buď detekovat změnu optické hustoty, elektrického náboje nebo změnu v magnetickém poli (změnu pohybu kovové kuličky).

Funkce hemokoagulační kaskády může být testována pomocí PT, aPTT a TT testů (viz níže).

1.3.1.1. Protrombinový čas (PT)

Protrombinový čas (PT) se používá k vyšetření vnější a společné cesty koagulační kaskády. Výsledkem tohoto testu je čas potřebný pro vytvoření sraženiny po přidání tromboplastinu (směs tkáňového faktoru, vápenatých iontů a fosfolipidů) do vyšetřované plazmy (Levy a kol., 2014; Yang a Moosavi, 2019). Fyziologické rozmezí je v tomto případě 12-15 s.

Prodloužení protrombinového času mimo jiné signalizuje nedostatek faktorů II, V, VII a X nebo nízké koncentrace fibrinogenu (Triplett, 2000; Levy a kol., 2014).

1.3.1.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT) testuje vnitřní a společnou cestu koagulační kaskády, a to všechny faktory s výjimkou faktoru VII a XIII. Výstupem aPTT je opět čas potřebný pro tvorbu krevní sraženiny. Fyziologické hodnoty aPTT se pohybují v rozmezí 25-40 s, obvykle ovšem kolem 35 (Rountree and Lopez, 2020).

1.3.1.3. Trombinový čas (TT)

Trombinový čas (TT) přímo testuje rychlost přeměny fibrinogenu na fibrin, měří čas (v s) do vzniku fibrinové sraženiny. Fyziologické hodnoty TT jsou obvykle do 20 s (Teruya a Kostousov, 2014).

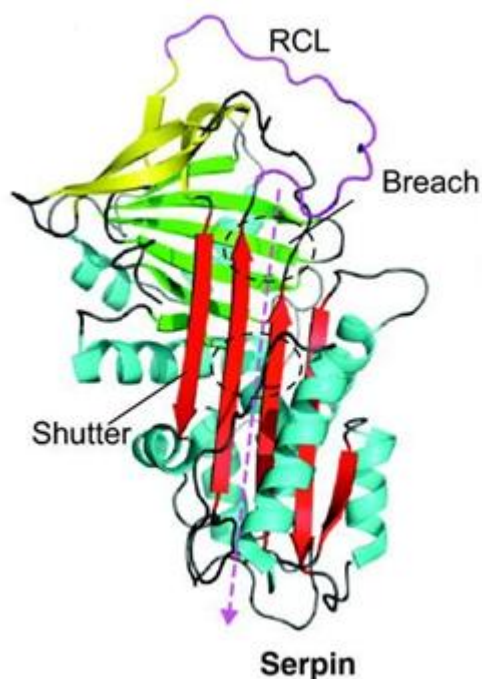
1.4. Serpiny

Serpiny jsou skupinou proteinů s průměrně 350-500 aminokyselinami, které jsou schopny inhibovat činnost serinových proteáz (byly identifikovány i serpiny inhibující kaspázy (Ray a kol., 1992; Law a kol., 2006) a cysteinové proteázy (Schick a kol., 1998; Irving, Pike a kol., 2002)). Vyskytují se u živočichů, rostlin, virů, bakterií i archeí (Law a kol., 2006). Jedná se o funkčně variabilní proteiny - inhibiční serpiny fungují např. v procesech kondenzace chromatinu v kuřecích erythrocytech (Grigoryev a Woodcock, 1998; Irving, Shushanov a kol., 2002; Law a kol., 2006), formace dorsoventrální osy a imunoregulace u drosofilů a dalších zástupců hmyzu (Ligoxygakis, Roth a Reichhart, 2003; Law a kol., 2006) či kontroly apoptózy (Ray a kol., 1992; Law a kol., 2006).

U člověka zastává většina serpinů inhibiční funkce, nejznámější jsou pro svou účast v procesu koagulace a fibrinolýzy, některé ovšem fungují jako chaperony (Nagata, 1996) nebo nádorové supresory (Zou a kol., 1994), patří sem i molekuly účastnící se regulace zánětlivé odpovědi (antitrypsin a antichymotrypsin) nebo molekuly využívané k hormonálnímu transportu (kortikosteroidy vázající globulin a globulin vázající tyroxin (Pemberton a kol., 1988)) (Silverman a kol., 2001; Law a kol., 2006).

Serpiny normálně zaujímají metastabilní konformaci, která je zásadní pro jejich inhibiční funkce. Jejich struktura typicky zahrnuje 3 β -skládané listy, 7-9 α -helixů a centrální reaktivní smyčku (RCL). RCL je esenciální částí serpinů, jelikož obsahuje místo rozpoznávané cílovou proteázou, a tak právě ona je zodpovědná za interakci s cílovým enzymem (Silverman a kol., 2001).

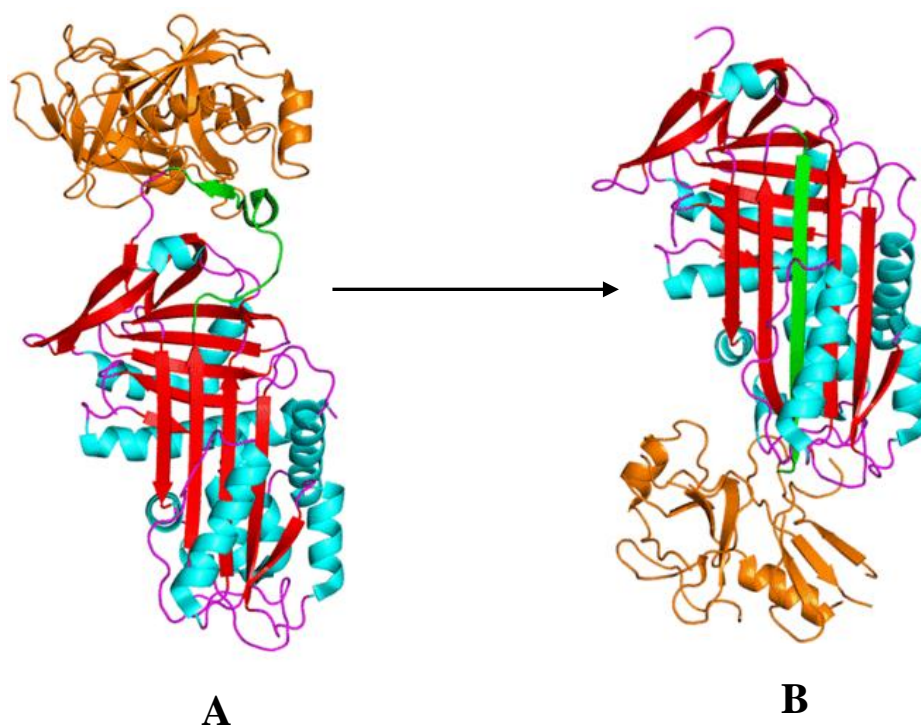
Nativní struktura serpinů je vyobrazena na Obr. 2.



Obr. 2: Nativní struktura serpinů (Law a kol., 2006). β -skládané listy (červené, zelené a žluté), α -helixy (tyrkysové) a smyčka s reaktivním centrem (RCL, fialová).

Serpiny inhibují serinové proteázy prostřednictvím konformační změny, ke které dojde po navázání enzymu na smyčku s reaktivním centrem a jejím štípnutí cílovou proteázou, a kterou se serpin dostává do stabilnějšího uspořádání. Mezi serpinem a proteázou se nejdříve vytváří kovalentní vazba, načež se RCL přesune i spolu s navázanou proteázou na opačný konec serpinu a vloží se do jednoho z β -skládaných listů (Silverman a kol., 2001; Rau a kol., 2007). Tak dojde k přerušení aktivního místa proteázy a tím k její inhibici (Olson a kol., 2001). Tato inhibice je ireversibilní (Rau a kol., 2007).

Zobrazení mechanismu inhibice serinové proteázy serpinem lze vidět na Obr. 3.



Obr. 3: Inhibiční mechanismus serpinů (Law a kol., 2006). Serinová proteáza kovalentně navázaná na RCL serpinu po jejím štípnutí (A) a stabilnější konformace serpinu po začlenění RCL do jednoho z β -skládaných listů (B).

Z hlediska krevní srážlivosti jsou důležitými serpiny antitrombin (ten kromě trombinu inhibuje i koagulační faktory IX, X a XI (Rau a kol., 2007)), inhibitor proteinu C (serpin s antikoagulačními i prokoagulačními účinky, jeho efekt závisí na cílové proteáze a přítomných kofaktorech (Pike a kol., 2005; Rau a kol., 2007)), inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (jeden z hlavních fyziologických inhibitorů aktivace plazminogenu (Vaughan, 2001; Cesarman-Maus a Hajjar, 2005; Rau a kol., 2007)), heparinový kofaktor II (inhibitor trombinu (Tollefsen, 2007)).

Jelikož hemostázy a fibrinolýzy se účastní řada serinových proteáz, serpiny hrají důležitou roli v regulaci a udržování těchto procesů v rovnováze potřebné pro udržování krevního toku. Poškození funkce serpinů, jejich nedostatek nebo naopak zvýšená produkce tak mohou vyústit v krvácivé či trombofilní stavy (Rau a kol., 2007).

Jiného významu serpiny nabývají u hematofágních živočichů, kteří čelí problému hemostázy při sání hostitelovy krve. Adaptace klíšťat tomuto způsobu výživy zahrnuje vazodilatační, protizánětlivé a protisrážlivé složky (včetně serpinů a dalších inhibitorů

proteáz) obsažené v jejich slinách (Ribeiro and Francischetti, 2003; Francischetti, Ivo, 2009; Chmelař a kol., 2017).

Na rozdíl od endogenních serpinů, které udržují hemostatické procesy ve fyziologické rovnováze, vstup exogenních serpinů do organismu vychyluje tuto rovnováhu směrem k inhibici koagulace, čímž si hematofágní živočichové zajišťují kontinuální proudění tekuté krve během sání.

2. Cíle práce

1. Zavést a optimalizovat metodu analýzy agregace trombocytů pomocí průtokové cytometrie
2. Pomocí této metody otestovat anti-hemostatické vlastnosti serpinů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*
3. Změřit antikoagulační účinky těchto serpinů pomocí koagulometru

3. Materiál a metody

3.1. Použité roztoky, protilátky, aktivátory a inhibitory

Reagencie a pufrы používané pro testování trombocytární agregace a aktivace jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Chemikálie použité pro testování agregace destiček.

Agregace destiček	
Název	Specifikace (složení/koncentrace)
HEPES pufr	132 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 20 mM HEPES (Gibco), 5 mM glukóza, destilovaná voda, pH – 7,4
Citrátový pufr (ACD)	85 mM TCD (trisodium citrate dihydrate) 66,6 mM CAM (citric acid monohydrate) 111 mM D-glukóza, destilovaná voda
CD9-APC (ThermoFisher, kat. č. 17-0091-82)	2 µg/ml klon eBioKMC8
CD9-FITC (ThermoFisher, kat. č. 11-0091-82)	5 µg/ml klon eBioKMC8
CD63-PE-Cy7 (ThermoFisher, kat. č. 25-0631-80)	0,4 µg/ml klon NVG-2
CD154-PE (ThermoFisher, kat. č. 12-1541-81)	0,4 µg/ml klon MR1
CD62P-APC (ThermoFisher, kat. č. 17-0626-80)	0,4 µg/ml klon Psel.K02.3
Kolagen (COL) (Sigma-Aldrich, kat. č. C9791-10MG)	Koncentrace dle protokolu

Katepsin G (CAT) (Sigma-Aldrich, kat. č. C4428-25UN)	Koncentrace dle protokolu
Phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 79346-1MG)	Koncentrace dle protokolu
Kyselina arachidonová (AA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 10931-250MG)	Koncentrace dle protokolu
Testované serpiny (IRS 2, IRS 3, IRS 5, IRS 8)	Připraveny rekombinantně v naší laboratoři Koncentrace dle protokolu
FACS pufr	0,1% azid sodný, 0,1% BSA, 1x PBS (Gibco), destilovaná voda

Složení TBS pufru a dalších reagensů používaných pro testování hemokoagulace (PT, aPTT a TT test) jsou uvedeny v Tab. II. Všechny reagensy, s výjimkou TBS a serpínů, byly zakoupeny jako set od firmy Technoclone.

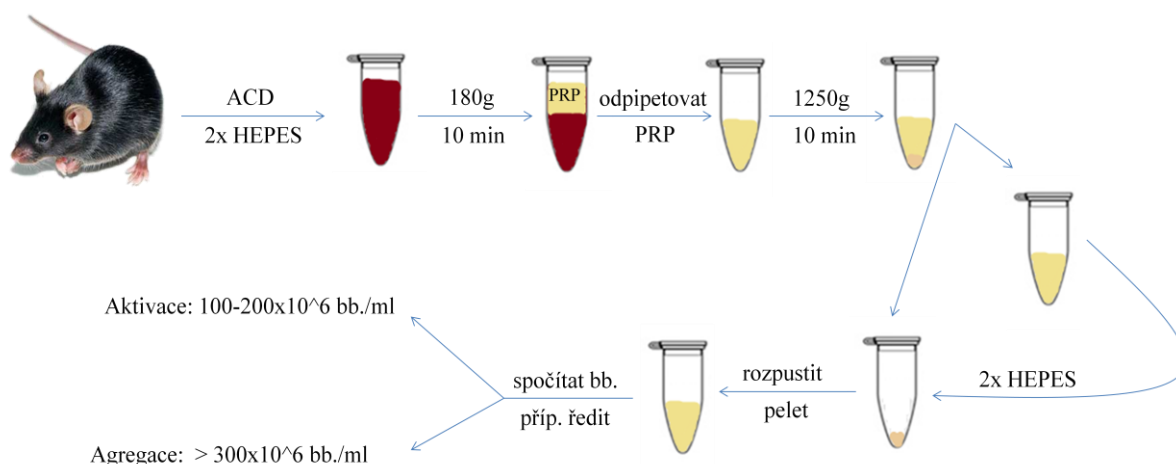
Tab. II: Chemikálie používané během testování hemokoagulace.

Hemokoagulace	
Název	Specifikace (složení/koncentrace)
TBS pufr	20 mM TRIS, 150 mM NaCl destilovaná voda, pH – 8
Kontrolní plazma (Coagulation Control N) (Technoclone)	
Technoplastin HIS (Ca-thromboplastin) (Technoclone)	
Daptin (Technoclone)	
CaCl₂ (Technoclone)	25 mmol/l
Trombin (Thrombin Reagent) (Technoclone)	20 I. U. bov. trombin

Testované serpiny (IRS 2 IRS 3 IRS 5 IRS 8)	6 μ M, příp. postupná ředící řada (viz Tab. III)
--	---

3.2. Příprava vzorků pro testy aktivace a agregace krevních destiček

Schematický přehled přípravy vzorků pro testování aktivace a agregace destiček je zobrazen na Obr. 4, 6 a 7. Podrobný popis je uveden v textu této kapitoly.



Obr. 4: Příprava plazmy pro agregační a aktivační testy.

3.2.1. Odběr krve

Myš (C57BL/6J) byla nejprve usnuta halotanem a následně přenesena na podložku bříškem nahoru (polštářek s halotanem byl umístěn myši na čenich). Pinzetou byla vytvořena kožní řasa v oblasti ramenního pletence, chirurgickými nůžkami byla nejdříve rozstříhnutá jen kůže (tak, aby byl vytvořen dostatečně velký prostor pro odběr krve) a následně byla stříhem do hloubky přerušena tepna v oblasti ramene. Vytékající krev byla okamžitě nasávána do pipety s ustřiženou špičkou a přenesena do zkumavky s 200 μ l ACD a několikrát promíchána pomocí pipety, aby se zabránilo sražení krve. Z jednoho jedince byl obvykle získán přibližně 1 ml krve. Myš byla po odběru usmrcena zlomením vazy.

3.2.2. Příprava PRP (Platelet Rich Plasma)

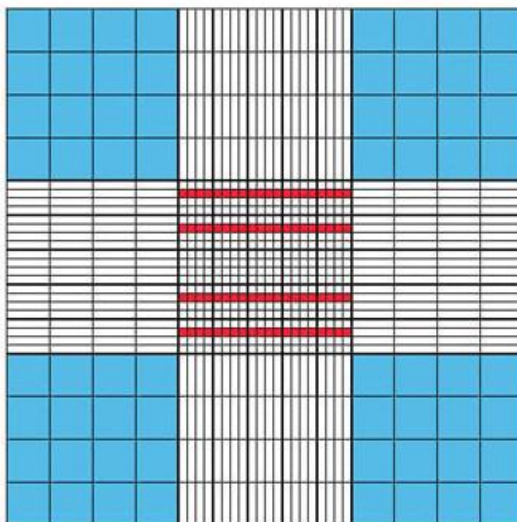
Získaná myší krev byla následně naředěna HEPES pufrem v poměru 1:1 a centrifugována 10 min při 25 °C na 180 g. U zcentrifugovaného vzorku se krevní sloupec viditelně rozdělil do 2 částí. PRP (Platelet Rich Plasma), neboli světle žlutavá složka nahoře, byla opatrně odpipetována do nové zkumavky, červená složka se v dalším postupu již nepoužívala (nákres rozdělení krevního sloupce je zobrazen na Obr. 4).

3.2.3. Ředění PRP

PRP byla poté centrifugována dalších 10 min při 25 °C na 1250 g, čímž se na dně zkumavky vytvořil pelet. Supernatant byl odpipetován do nové zkumavky, 2x naředěn HEPES pufrem a následně byl pomocí něj rozsuspendován pelet vzniklý předchozím stočením.

3.2.4. Počítání destiček

Destičky byly počítány v Neubauerově komůrce (Neubauer Improved Petroff Chamber, Marienfeld) s použitím světelného mikroskopu. Počet trombocytů jsem spočítala v 80 malých čtvercích (viz Obr. 5) a podle vzorce níže byla vypočítána koncentrace destiček v 1 μ l krve.



Obr. 5: Nákres Neubauerovy komůrky. Červeně jsou zvýrazněné malé čtverce, ve kterých byly počítány krevní destičky.

$$\frac{\text{počet destiček v malých čtvercích} \times \text{ředění vzorku}}{\text{počet malých čtverců (80)} \times \text{objem nad 1 malým čtvercem (0,000025 \mu\text{l})}}$$

V případě agregace bylo nejlepší mít koncentraci trombocytů minimálně $300 \times 10^6/\text{ml}$, aby bylo jejich shlukování dobře detekovatelné. U testování aktivace destiček bylo podle našich zkušeností a výsledků nejvýhodnější držet jejich koncentraci v rozmezí $100\text{--}200 \times 10^6/\text{ml}$. V případě vyššího počtu destiček než je toto rozmezí (v několika případech byla získána PRP s koncentracemi trombocytů $400 \times 10^6/\text{ml}$ či $500 \times 10^6/\text{ml}$), byl vzorek naředěn na požadovanou koncentraci.

3.2.5. Další zpracování vzorku

U každého pokusu byla testována negativní kontrola, aktivované vzorky (triplikáty v počtu závislém na množství testovaných vzorků), inhibované vzorky (opět triplikáty v počtu závislém na množství testovaných vzorků) a nebarvená kontrola (v tomto případě byla použita jen 1 zkumavka, jelikož šlo pouze o kontrolu správného obarvení vzorků).

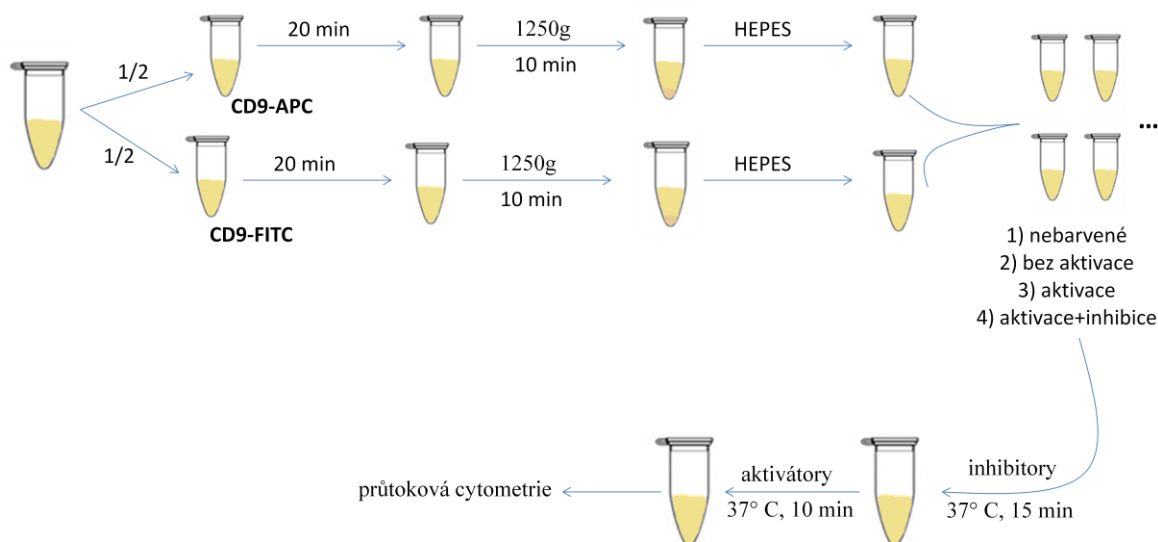
3.2.5.1. Agregace

Z připraveného finálně naředěného vzorku PRP bylo odebráno 100 μ l do 5ml FACS zkumavky (tento vzorek sloužil jako nebarvená kontrola) a zbytek plazmy byl rozdělen napůl do dvou 1,5ml zkumavek, do kterých byl přidán 1 μ l protilátky (do jedné CD9-APC, do druhé CD9-FITC). Destičky se poté nechaly s protilátkami inkubovat 20 min v lednici.

Po inkubaci byly zkumavky centrifugovány 5 min na 1250 g, supernatant byl odebrán a pelet byl rozsuspendován v 600 μ l HEPES pufru. Do potřebného počtu FACS zkumavek (všechny vzorky byly testovány v triplicacích) se napipetovalo 50 μ l suspenze destiček značených buď CD9-APC nebo CD9-FITC.

K určitým vzorkům byly přidány inhibitory i aktivátory a proběhla inkubace dle článku De Cuyper a kol., 2013 (třepání 160 ot./min. s inhibitory 15 min při 37 °C a následně třepání 190 ot./min. s aktivátory 10 min při 37 °C), k jiným byly přidány jen aktivátory (třepání 190 ot./min. 10 min při 37 °C) a ke zbylým se přidalo odpovídající množství HEPES pufru (negativní kontrola).

Testované inhibitory a aktivátory i jejich koncentrace jsou uvedeny v Tab. I. Schema přípravy vzorků pro agregační testy je vyobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6: Další zpracování vzorků pro testování agregace.

3.2.5.2. Aktivace

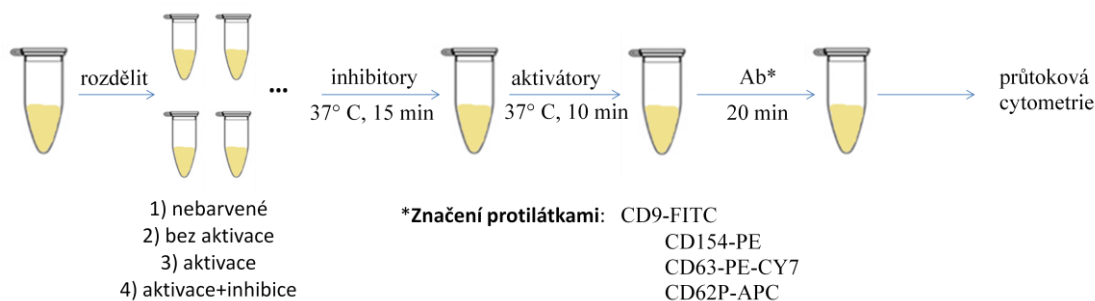
V případě aktivace se z naředěné PRP odebralo 100 µl do 5ml FACS zkumavky, která sloužila jako nebarvená kontrola, a zbytek plazmy se rozdělil po 100 µl do potřebného množství FACS zkumavek (v triplikacích).

Poté byly do příslušných zkumavek přidány inhibitory i aktivátory (třepání s inhibitory 160 ot./min. 15 min při 37 °C a následně třepání 190 ot./min. s aktivátory 10 min při 37 °C), k jiným byly přidány jen aktivátory (třepání 190 ot./min. 10 min při 37 °C) a ke zbylým se přidalo odpovídající množství HEPES pufru (negativní kontrola).

Do všech zkumavek, kromě nebarvené kontroly, byly přidány 2 µl od každé 10x naředěné protilátky (CD9-FITC, CD62P-APC, CD63-PE-Cy7, CD154-PE). Následovalo značení protilátkami v lednici při 4°C po dobu 20 min.

Poté byly vzorky promyty 1 ml FACS pufru, vzorky byly stočeny 5 min na 500 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl rozsuspendován ve 100 µl FACS pufru.

Testované inhibitory a aktivátory i jejich koncentrace jsou uvedeny v Tab. I. Příprava vzorků pro aktivační testy je znázorněna na Obr. 7.



Obr. 7: Další zpracování vzorků pro testování aktivace.

3.2.6. Inhibitory

Jako inhibitory byly testovány 4 druhy serpinů (IRS 2, IRS 3, IRS 5 a IRS 8), které byly izolovány a rekombinantně připraveny v laboratoři Katedry medicínské biologie Přírodovědecké fakulty JU v Českých Budějovicích v rámci předchozího výzkumu.

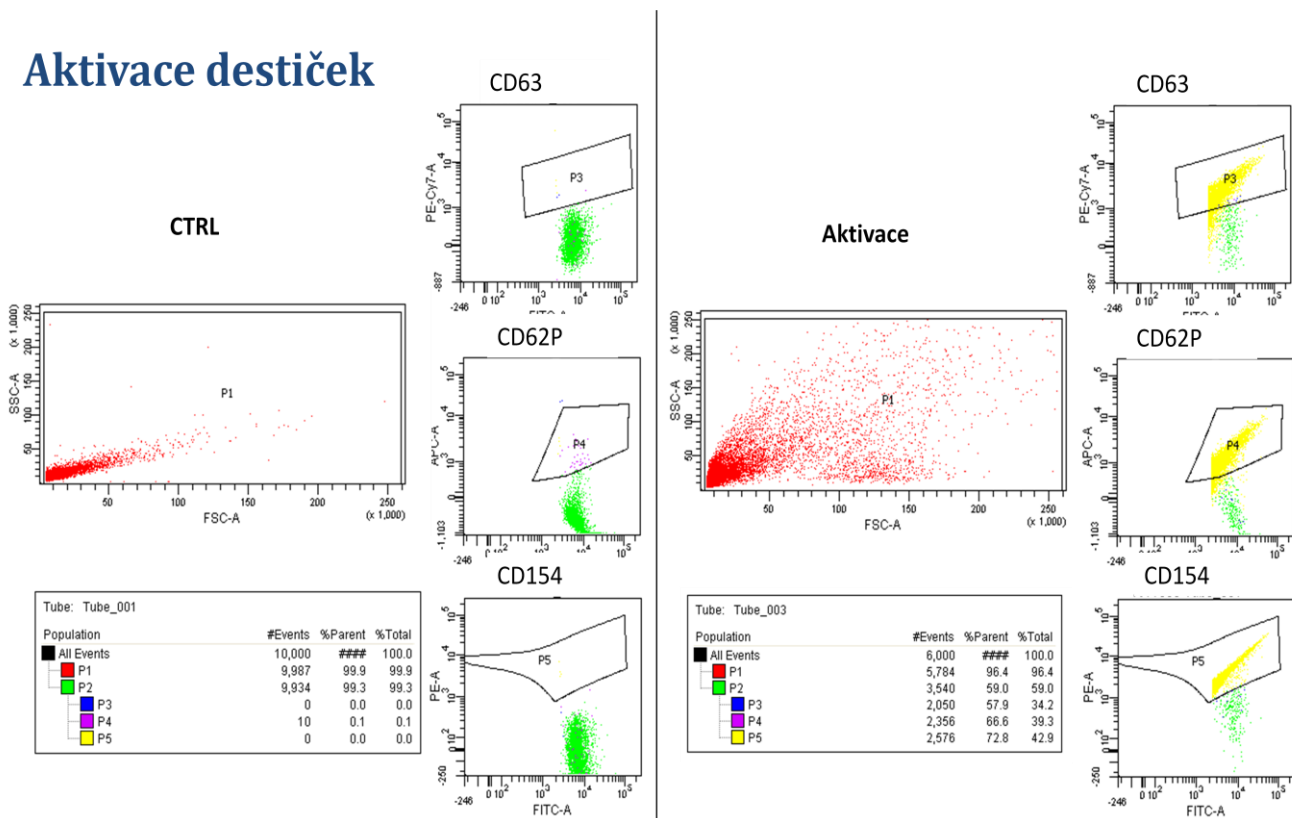
3.2.7. Analýza výsledků

Finálně zpracované vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru (FACS Canto II, BD Bioscience), výsledky experimentů byly získány pomocí softwaru BD FACSDiva (v 6.1.3).

Procentuální zastoupení jednotlivých trombocytárních populací bylo zpracováno do podoby grafu v tabulkovém procesoru Microsoft Excel.

Grafické znázornění četnosti jednotlivých populací bylo vyexportováno ve formátu PDF. Příklady grafického výstupu z průtokového cytometru s podrobným popisem jsou uvedeny na Obr. 8 a 9.

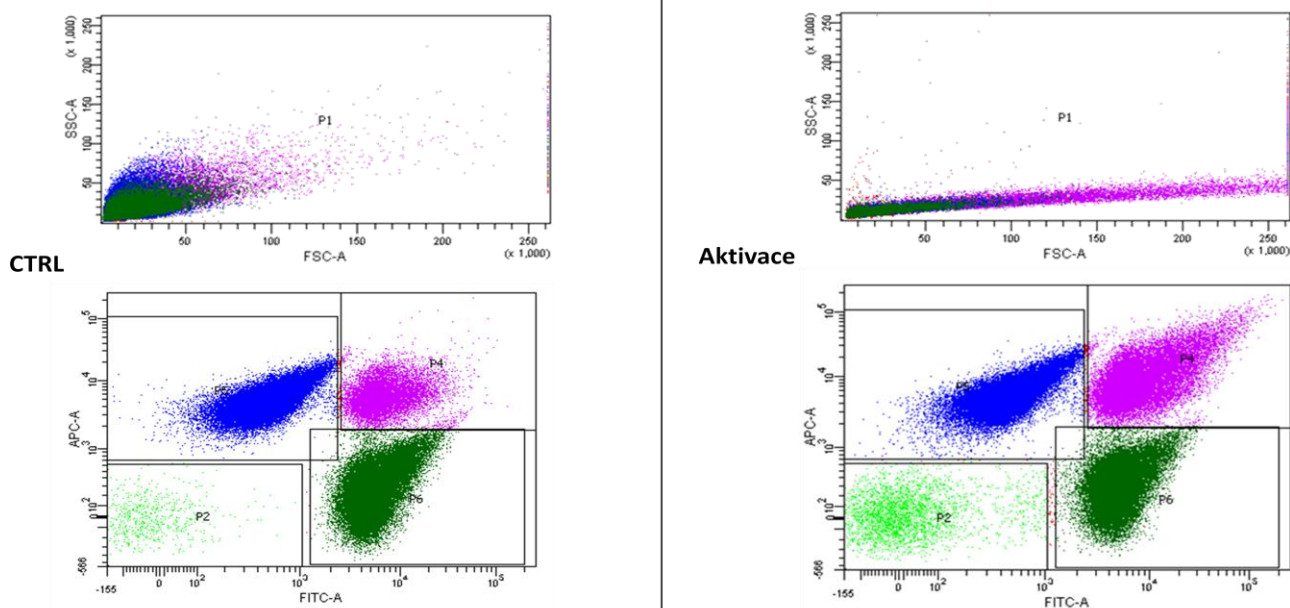
Výsledky byly statisticky zpracovány jednocestnou ANOVOU, nicméně nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly ve výsledcích.



Obr. 8: Příklad grafického znázornění výsledků aktivačních testů. Kontrolní vzorek (CTRL) je zobrazen v levé polovině a aktivovaný vzorek (Aktivace) v pravé polovině obrázku, změny velikosti a granularity jsou znázorněny v obdélníku s červeně zvýrazněnými tečkami (populace P1), změny exprese jednotlivých povrchových molekul (CD63, CD62P a CD154) jsou vyobrazeny ve třech menších obdélnících. Posun červeně znázorněných bodů

doprava v rámci forward scatter (FSC-A) naznačuje posun k větším velikostem a tedy agregaci, posun nahoru v rámci side scatter (SSC-A) představuje posun k větší granularitě, tedy degranulaci krevních destiček. Zelená populace P2 je vyobrazením původního neaktivovaného stavu krevních destiček, žluté tečky (populace P3, P4 a P5) pak představují nárůst exprese sledovaných povrchových molekul. Procentuální zastoupení jednotlivých populací je uvedeno v tabulce v levém dolním rohu.

Agregace destiček



Obr. 9: Příklad grafického znázornění výsledků agregačních testů. Kontrolní vzorek (CTRL) je zobrazen v levé polovině a aktivovaný vzorek (Aktivace) v pravé polovině obrázku, změny velikosti a granularity jsou znázorněny v obdélnících nahoře (populace P1), zastoupení jednotlivých populací buněk je zobrazeno dole. Posun P1 populace doprava v rámci forward scatter (FSC-A) naznačuje posun k větším velikostem a tedy agregaci, posun nahoru v rámci side scatter (SSC-A) představuje posun k větší granularitě, tedy degranulaci krevních destiček. Světle zelená populace P2 zobrazuje CD9 negativní buňky, modře značené eventy (populace P5) představují buňky značené CD9-APC protilátkou, tmavě zelené eventy (populace P6) představují buňky značené CD9-FITC protilátkou a fialově značená populace P4 odpovídá dvojitě pozitivním agregátům. Nárůst v populaci P4 představuje nárůst počtu agregovaných krevních destiček.

3.3. Koagulační testy

Serpiny a reagentie používané pro testování hemokoagulace a jejich specifikace jsou uvedeny v Tab. II.

3.3.1. Protrombinový čas (PT)

Pro vyšetření PT byla použita kontrolní plazma (Coagulation Control N), technoplastin a testované serpiny. Plazma i technoplastin se nechaly nahřívat v koagulometru při 37 °C (plazma 1 min, technoplastin alespoň 2 min). Ke 100 µl plazmy se přidalo 200 µl technoplastinu a ihned se začal měřit čas do vytvoření fibrinové sraženiny.

Nejprve byly pomocí koagulometru orientačně otestovány účinky všech čtyř typů serpinů v koncentraci 6 µM, poté byla otestována postupná řada koncentrací od IRS 3 jako neúčinnějšího serpinu (viz Tab. III). Ke kontrolní plazmě byl přidán stejný objem TBS jako byl objem serpinů u testovaných vzorků. Test byl proveden nezávisle třikrát.

3.3.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

V případě aPTT byla použita kontrolní plazma (Coagulation Control N), Dapttin a CaCl₂. Dapttin a CaCl₂ byly nahřívány v koagulometru při 37 °C. Ke 100 µl plazmy bylo přidáno 100 µl Dapttinu, zkumavka byla krátce protřepána a inkubována 2 min při 37 °C. Poté se ke vzorku přidalo 100 µl CaCl₂ a ihned se začal měřit čas do vytvoření fibrinové sraženiny.

Nejprve byly pomocí koagulometru orientačně otestovány účinky všech čtyř serpinů v koncentraci 6 µM, poté byla otestována postupná řada koncentrací IRS 8 jako neúčinnějšího serpinu (viz Tab. III). Ke kontrolní plazmě bylo přidáno stejné množství TBS jako množství serpinů u testovaných vzorků. Test byl proveden nezávisle třikrát.

Tab. III: Ředící řada použitá u serpinů IRS 3 (PT test) a IRS 8 (aPTT test).

Koncentrace serpinu
6 μM
3 μM
1,5 μM
0,75 μM
0,375 μM
0,188 μM
0,094 μM

3.3.3. Trombinový čas (TT)

Při testování TT byla použita kontrolní plazma (Coagulation Control N) a trombin (Thrombin Reagent). Plazma (200 μl) byla inkubována při 37 °C po dobu 1 min, poté k ní bylo přidáno 200 μl trombinu a ihned se začal měřit čas do vzniku fibrinové sraženiny.

Pomocí koagulometru byly orientačně otestovány účinky všech čtyř typů serpinů v koncentraci 6 μM . Ke kontrolní plazmě bylo přidáno stejné množství TBS jako množství serpinů u testovaných vzorků.

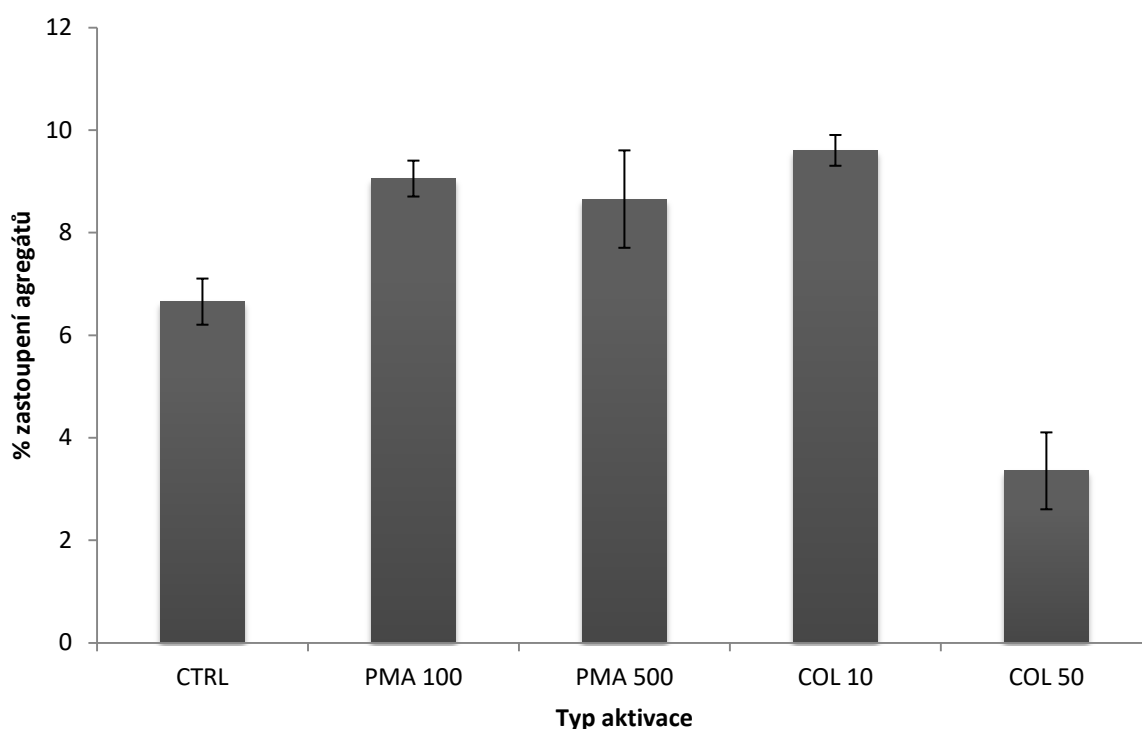
3.3.4. Analýza výsledků

Výsledky koagulačních testů byly zpracovány jednocestnou ANOVOU v programu Statistica 13.

4. Výsledky

4.1. Agregace destiček

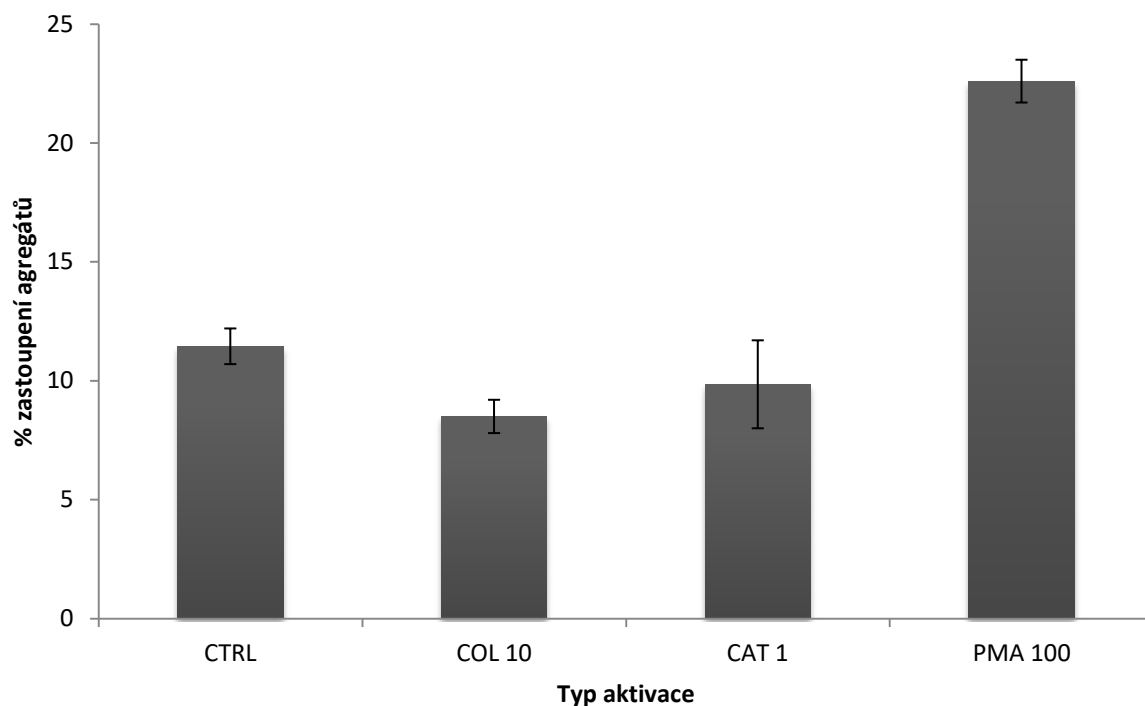
Zprvu jsme potřebovali zjistit, jaký aktivátor a jaká koncentrace daného aktivátoru způsobí nárůst agregace krevních destiček. Nejdříve jsem zkusila trombocyty aktivovat různými koncentracemi PMA a kolagenu (10 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$ u kolagenu a 100 ng/ml a 500 ng/ml u PMA, viz Obr. 10).



Obr. 10: Srovnání agregace trombocytů u kontrolního vzorku a vzorků aktivovaných různými koncentracemi PMA a kolagenu. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace), PMA 100 (PMA v koncentraci 100 ng/ml), PMA 500 (PMA v koncentraci 500 ng/ml), COL 10 (kolagen v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$), COL 50 (kolagen v koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$).

Na Obr. 10 lze vidět, že obě koncentrace PMA a kolagen v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ způsobily srovnatelné, nicméně zanedbatelné navýšení agregace destiček. V případě koncentrace kolagenu 50 $\mu\text{g/ml}$ byla agregace oproti kontrolnímu vzorku dokonce poloviční. Kvůli neúspěšným pokusům o aktivaci trombocytární agregace jsme zvýšili množství krevních destiček ve vzorcích, jelikož pro agregační testy je optimální pracovat se vzorky obsahujícími minimálně 300×10^6 bb./ml. Za těchto předpokladů jsem znovu otestovala

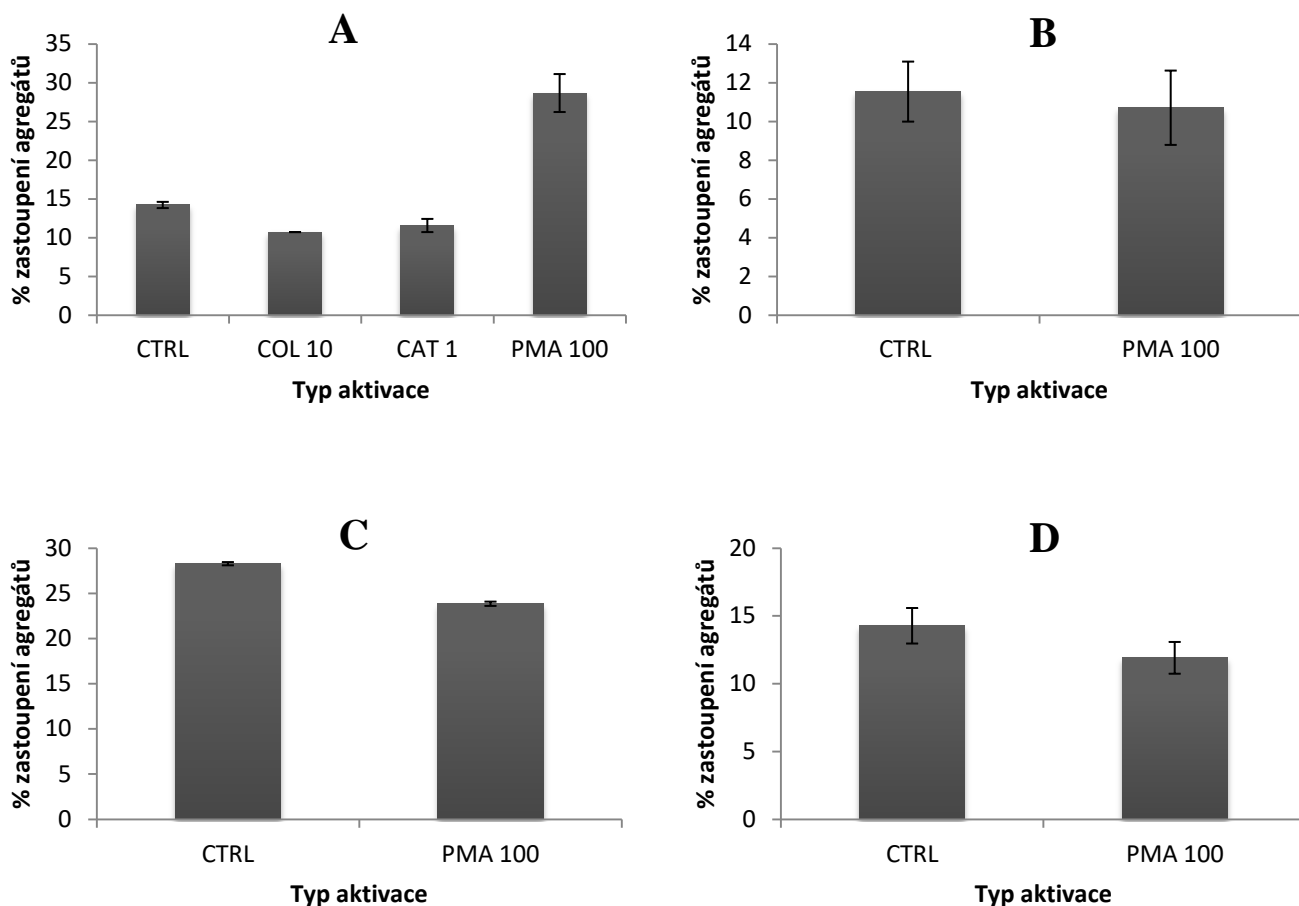
kolagen (koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$), PMA (100 ng/ml) a katepsin G (v 1 μM koncentraci), jakožto další z aktivátorů krevních destiček (viz Obr. 11).



Obr. 11: Účinky kolagenu, katepsinu G a PMA na agregaci krevních destiček. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace), COL 10 (kolagen v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$), CAT 1 (1 μM katepsin G), PMA 100 (PMA v koncentraci 100 ng/ml). Počet trombocytů = 300×10^6 bb./ml.

Obr. 11 ukazuje, že u kolagenu a katepsinu G jsem ve srovnání s neaktivovanou kontrolou nezaznamenala žádný nárůst agregace destiček. Tentokrát aktivace pomocí PMA (100 ng/ml) fungovala a agregace vzrostla o přibližně 10 % - 15 %.

Úplně stejný postup byl použit i v následujících čtyřech pokusech (viz Obr. 12). Přestože pokusy byly prováděny co nejjednodušeji, počty trombocytů byly u testovaných vzorků minimálně 300×10^6 bb./ml, aby bylo navýšení agregace detekovatelné, a koncentrace aktivátorů byly také stejné, úspěšné aktivace agregace vyvolané PMA bylo dosaženo už jen v 1 z dalších pokusů (Obr. 12 A). U dalších experimentů, kdy jsem se chtěla začít soustředit na účinky serpinů na agregaci, byly výsledky negativní (Obr. 12 B, C a D).

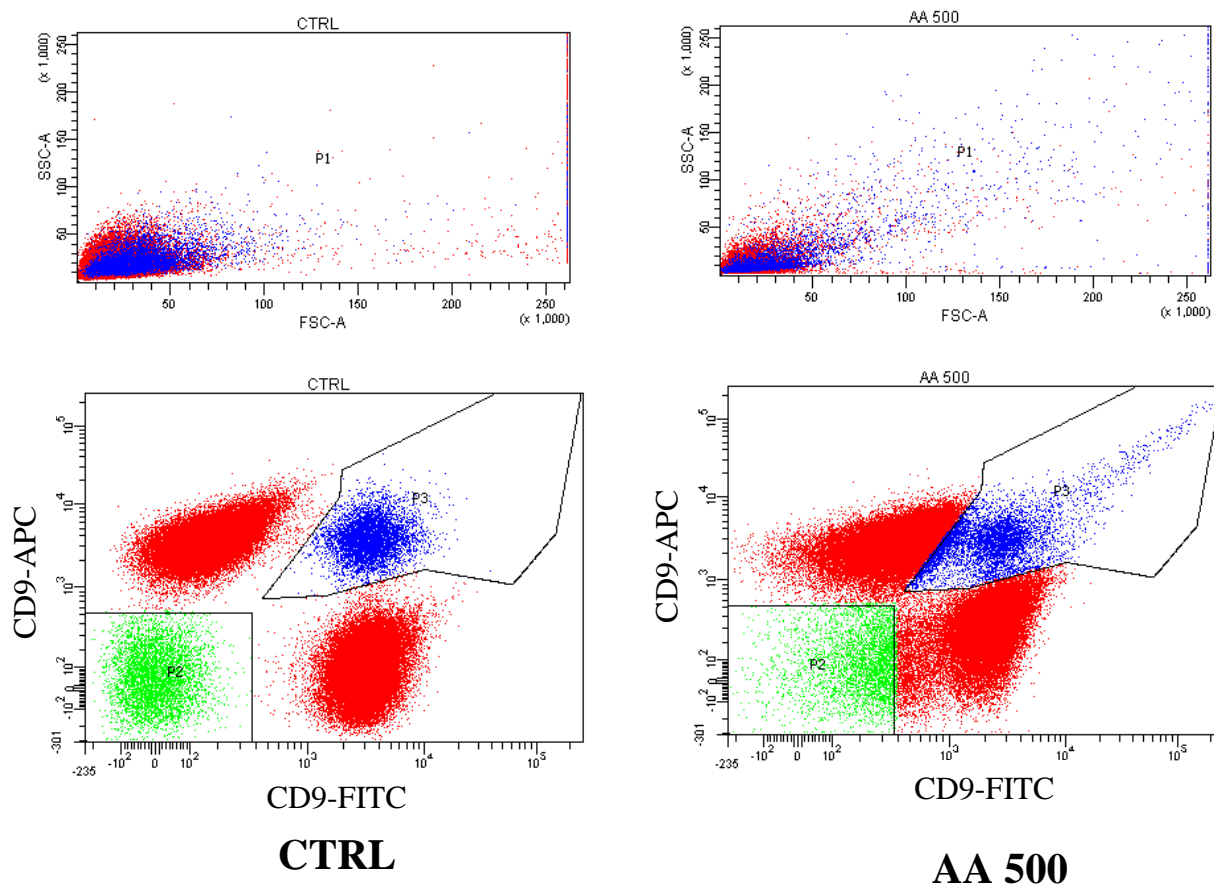


Obr. 12: Účinky kolagenu, katepsinu G a PMA na agregaci krevních destiček. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace), COL 10 (kolagen v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$), CAT 1 (1 μM katepsin G), PMA 100 (PMA v koncentraci 100 ng/ml). Počet trombocytů = 340×10^6 bb./ml .

Na Obr. 12 A je vidět, že aktivace trombocytární agregace pomocí PMA fungovala při vyšší koncentraci krevních destiček ještě lépe než v předchozím případě (Obr. 11). Přes nadějně výsledky (Obr. 12 A) nicméně stejný postup přestal fungovat a už se mi pomocí PMA nepodařilo dosáhnout takového procenta agregátů.

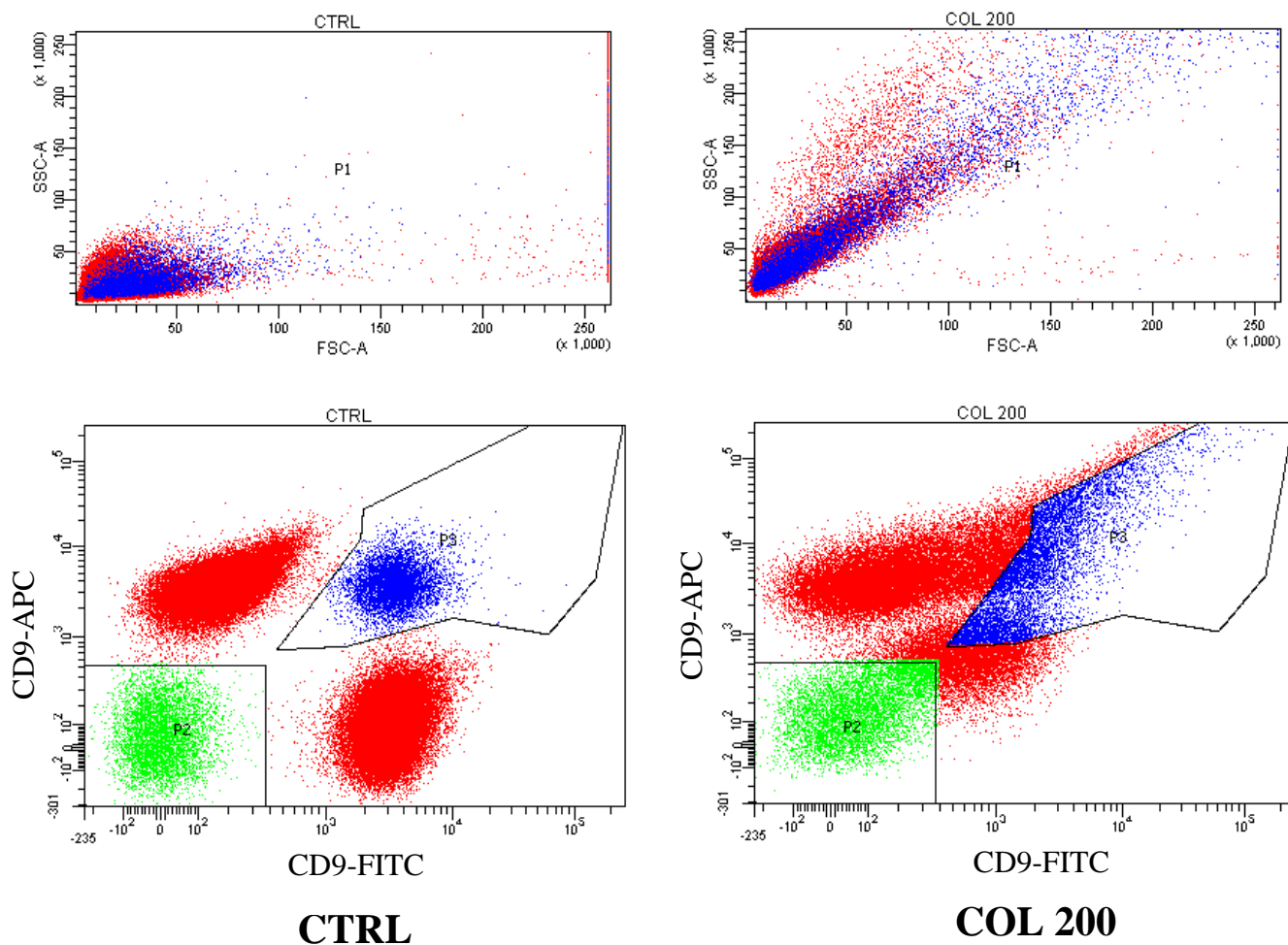
Vzhledem k tomu, že se nám tedy nepodařilo optimalizovat pokusy s aktivací agregace pomocí PMA, a tím pádem nebylo možno ani začít testovat účinky serpinů, přistoupila jsem k testování dalšího potenciálního aktivátoru destiček (arachidonové kyseliny) a ještě vyšší koncentrace kolagenu 200 $\mu\text{g/ml}$ (nechtěli jsme od něj upustit, jelikož funguje jako fyziologický aktivátor trombocytů v cévách). Grafické znázornění výsledků je vidět na Obr. 13 a Obr. 14, kvantitativní zhodnocení nebylo možné, jelikož se začaly jednotlivé

trombocytární populace slévat dohromady, a tak jsem pomocí průtokového cytometru nemohla určit procentuální zastoupení těchto populací.



Obr. 13: Aktivace agregace krevních destiček pomocí arachidonové kyseliny (AA). CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace) v levé části a AA 500 (arachidonová kyselina v koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$) v pravé části.

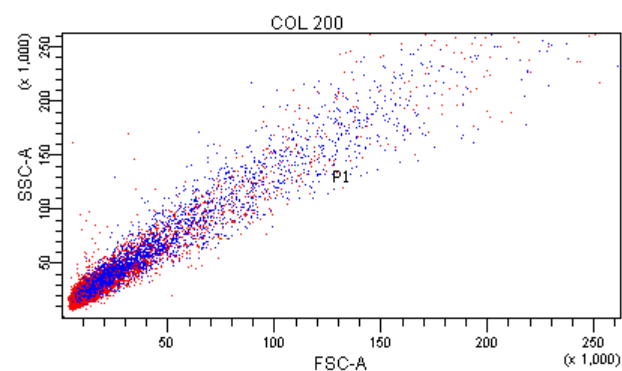
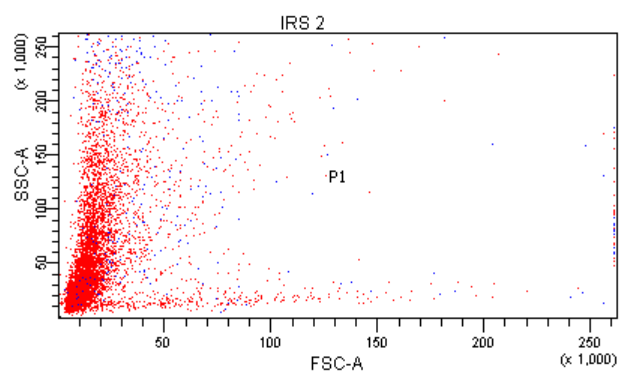
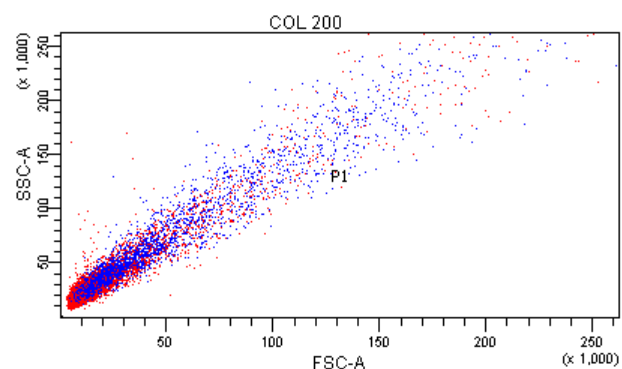
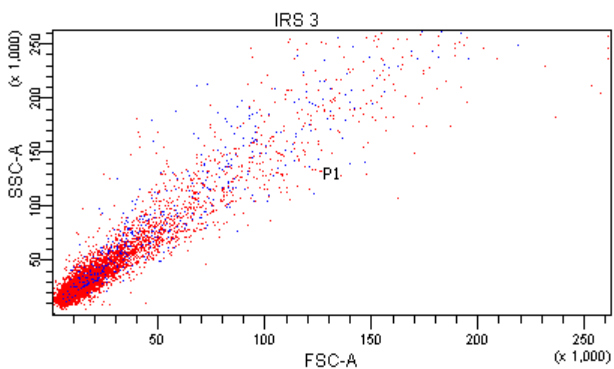
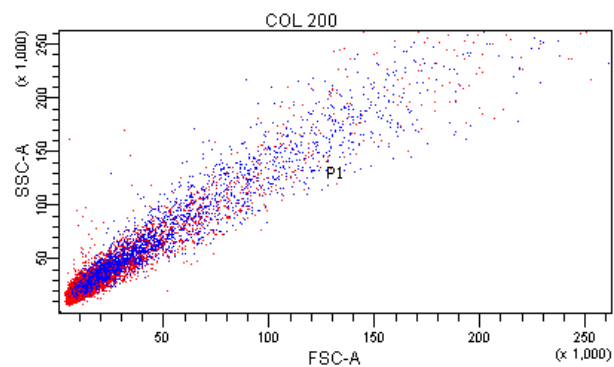
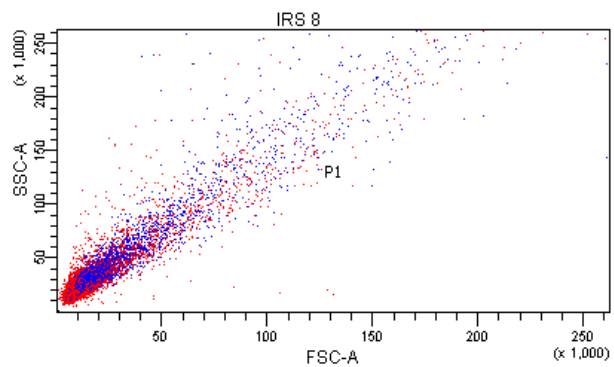
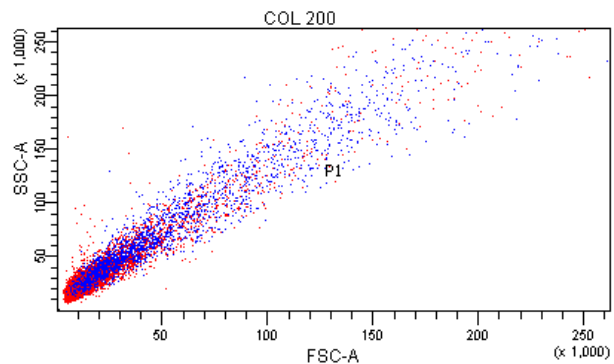
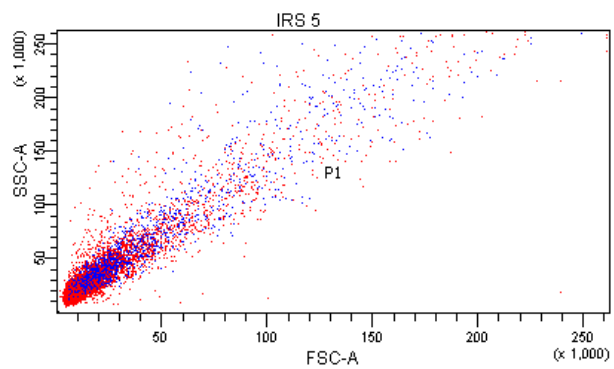
Na Obr. 13 lze vidět, že po aktivaci arachidonovou kyselinou nenastaly žádné významné změny v rámci FSC-A ani SSC-A.



Obr. 14: Aktivace agregace krevních destiček kolagenem. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace) v levé části a COL 200 (kolagen v koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$) v pravé části.

Aktivace kolagenem (Obr. 14) vedla k viditelně výraznější aktivitě krevních destiček než aktivace arachidonovou kyselinou (Obr. 13), došlo k posunu doprava na forward scatter (FSC-A) i nahoru u side scatter (SSC-A), což by signalizovalo degranulaci trombocytů a vznik agregátů. Nicméně spojení obou populací dohromady opět znemožňovalo další vyhodnocení výsledků.

Přestože metoda průtokové cytometrie nebyla vhodná pro kvantitativní determinaci výsledků trombocytární agregace, alespoň orientačně jsme chtěli vidět, jak budou FSC-A a SSC-A ovlivněny testovanými serpiny. Výsledky tohoto pokusu jsou vyobrazeny na Obr. 15.



SERPINY

COL 200

Obr. 15: Srovnání aktivace kolagenem (koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$) v pravé části se vzorky inkubovanými se serpiny (ve 2 μM koncentraci) v levé části.

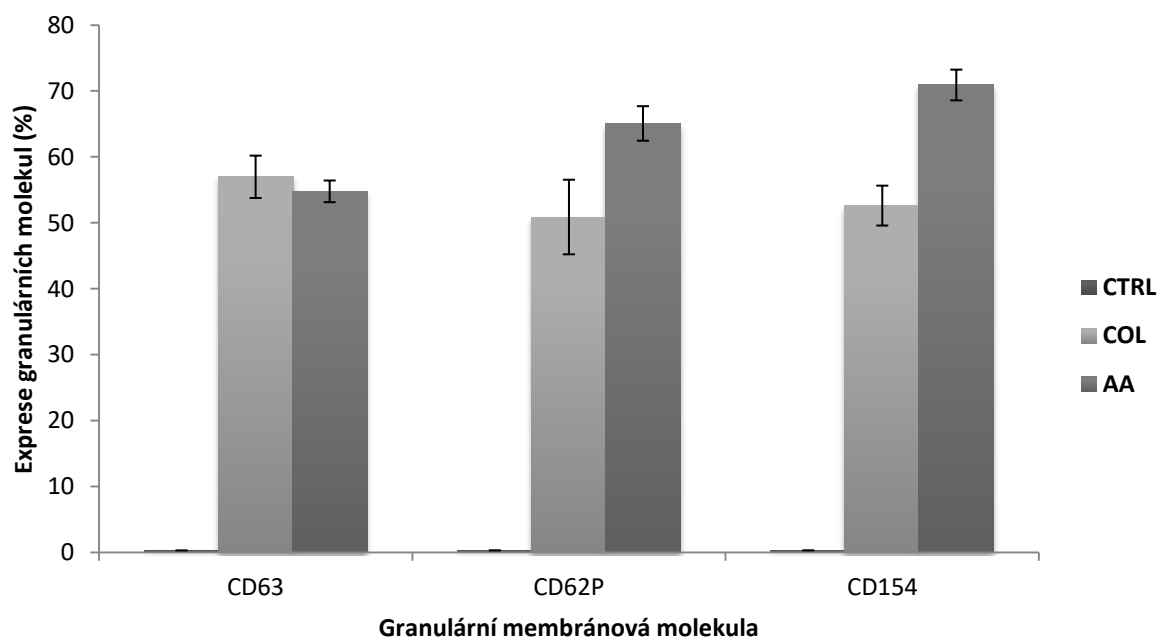
IRS 2 jako jediný vedl k posunu eventů doleva v rámci forward scatter (Obr. 15), tedy k menším velikostem.

4.2. Aktivace destiček

Po neúspěchu s agregací destiček jsme přistoupili k testování jejich aktivace pomocí detekce zvyšování exprese granulárních membránových molekul (CD62P, CD63 a CD154).

4.2.1. Testování aktivátorů

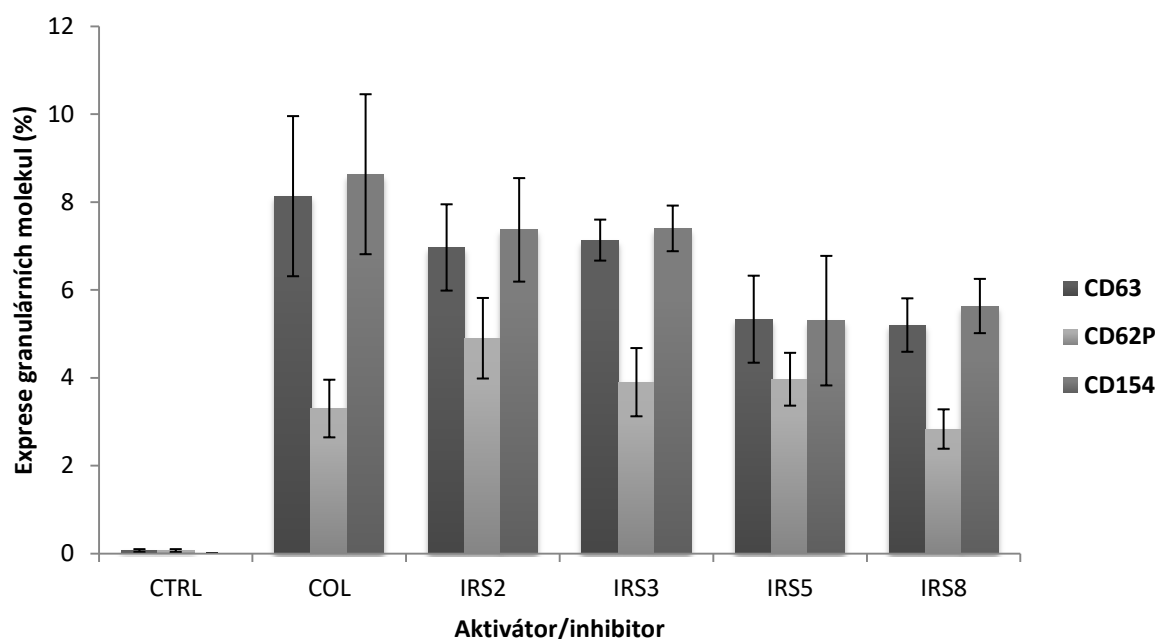
Jako aktivátory jsem zkoušela kolagen (200 $\mu\text{g/ml}$) a kyselinu arachidonovou (1000 $\mu\text{g/ml}$). Výsledky takto vyvolané aktivace jsou uvedeny na Obr. 16.



Obr. 16: Expresa granulárních membránových molekul. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace), COL (aktivace kolagenem, koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$), AA (arachidonová kyselina v koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$).

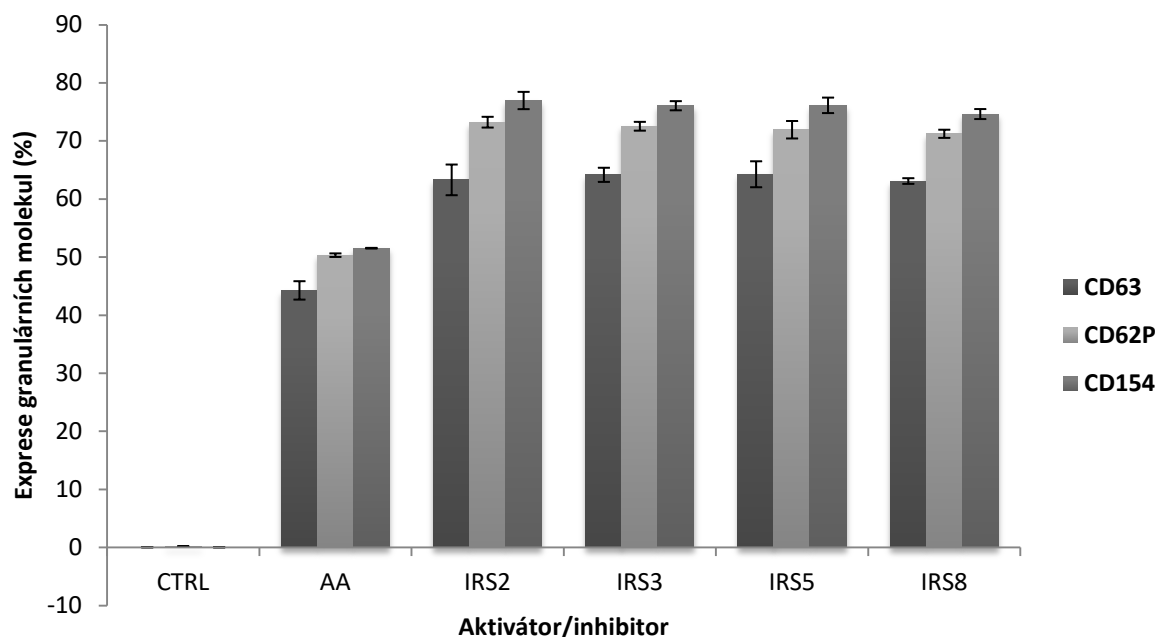
4.2.2. Testování inhibice aktivace destiček

Jelikož kolagen i arachidonová kyselina vedly ke zvýšení exprese granulárních molekul o 50 % a více (Obr. 16), začala jsem sledovat účinky serpinů na kolagenní (viz Obr. 17) i aktivaci arachidonovou kyselinou (Obr. 18). Koncentrace serpinů byly 2 μ M.



Obr. 17: Aktivace kolagenem a její změna po inkubaci se serpiny. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace a inhibice), COL (aktivace kolagenem, koncentrace 200 μ g/ml).

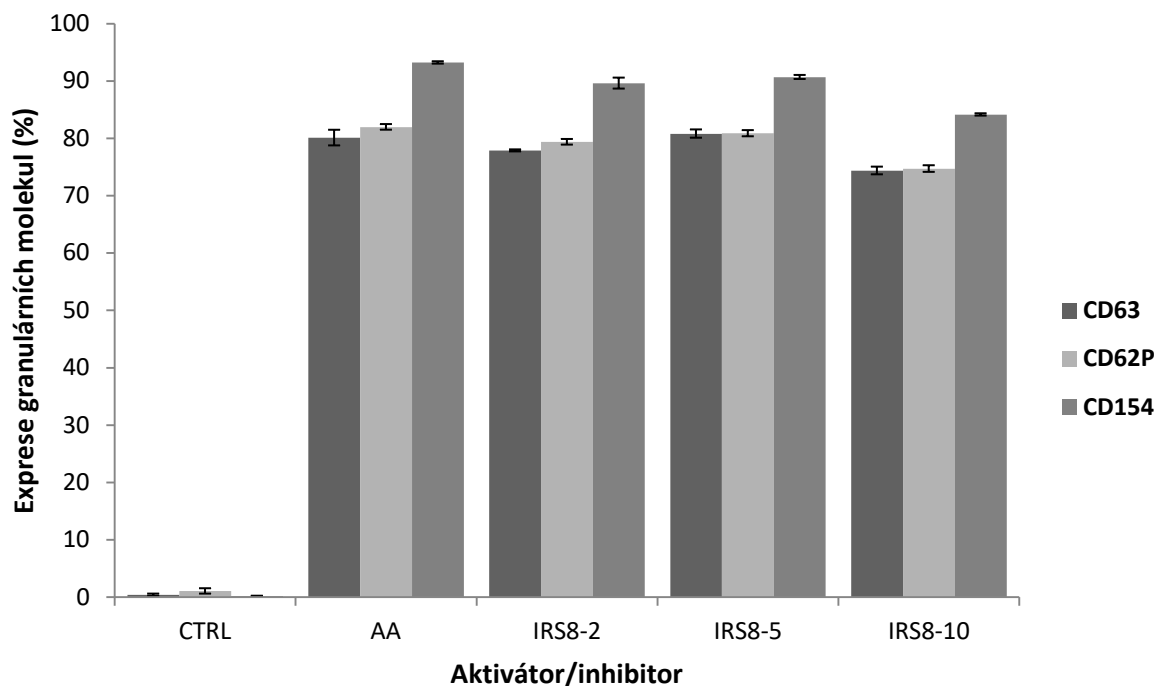
V případě kolagenu nedošlo k nijak výrazné aktivaci ani inhibici. U CD63 a CD154 jsme pozorovali mírné snížení exprese u všech testovaných serpinů, ovšem maximálně 3%, CD62P se dokonce nepatrně navýšil či udržoval na stejné hladině (Obr. 17).



Obr. 18: Aktivace arachidonovou kyselinou a její změna po inkubaci se serpiny. CTRL (kontrolní vzorek bez aktivace a inhibice), AA (aktivace arachidonovou kyselinou, koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$).

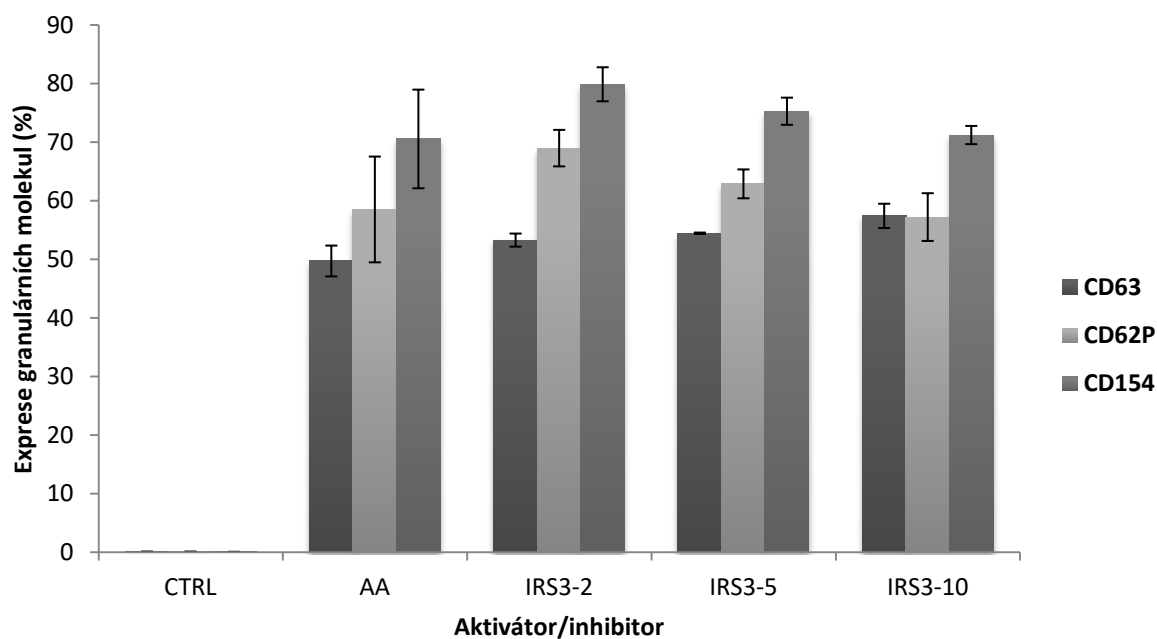
U aktivace arachidonovou kyselinou vyvolaly všechny serpiny navýšení, a to o více jak 20 % (Obr. 18).

Jelikož výsledky neodpovídaly našim očekáváním, rozhodli jsme se otestovat vliv tří různých koncentrací (2 μM , 5 μM a 10 μM) od každého serpinu na aktivaci arachidonovou kyselinou (ta totiž vedla k vyšší expresi molekul spojených s aktivací trombocytů) pro pozorování detailnějších změn. Použitá koncentrace arachidonové kyseliny byla 1000 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky všech pokusů lze vidět na Obr. 19, Obr. 20, Obr. 21 a Obr. 22.



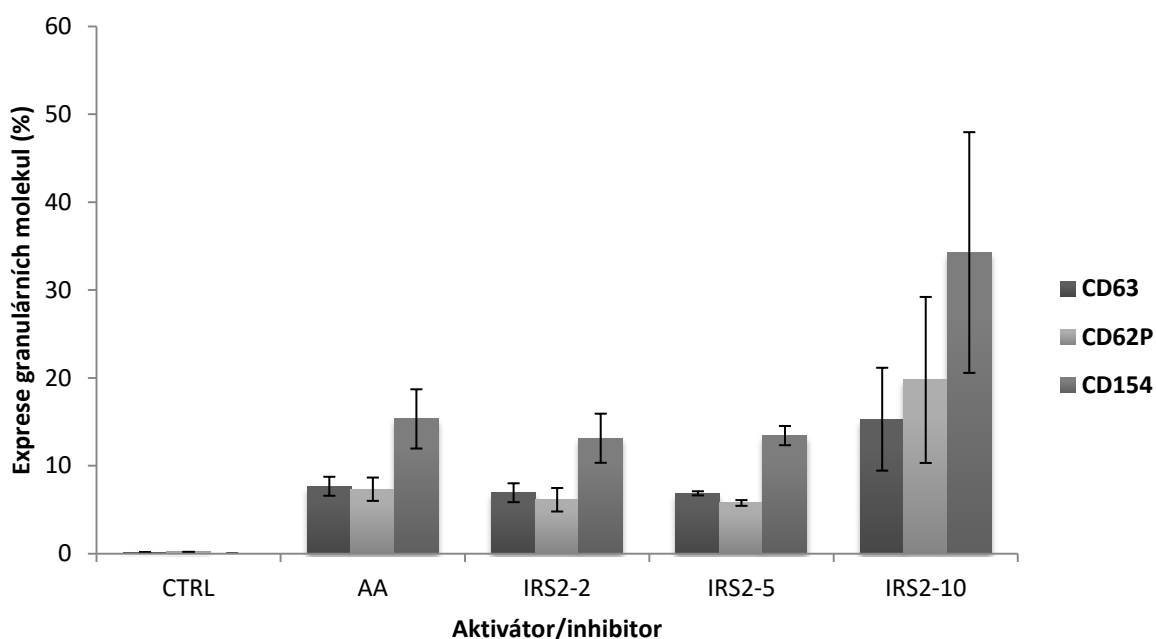
Obr. 19: Expresa povrchových molekul ovlivněná 2 μ M (IRS8-2), 5 μ M (IRS8-5) a 10 μ M IRS 8 (IRS8-10). AA (arachidonová kyselina v koncentraci 1000 μ g/ml).

Ani jedna z koncentrací IRS8 nijak neovlivnila expresi granulárních molekul (Obr. 19).



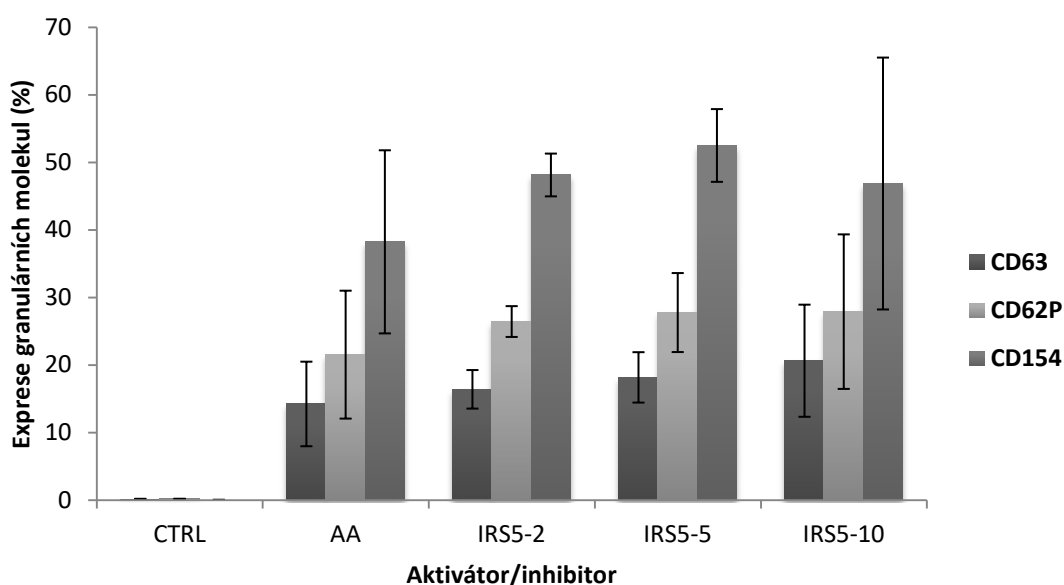
Obr. 20: Expresa povrchových molekul ovlivněná 2 μ M (IRS3-2), 5 μ M (IRS3-5) a 10 μ M IRS 3 (IRS3-10). AA (arachidonová kyselina v koncentraci 1000 μ g/ml).

V případě IRS 3 opět nedošlo k inhibici aktivace trombocytů, naopak jsme zaznamenali mírné navýšení exprese sledovaných granulárních molekul (Obr. 20).



Obr. 21: Expese povrchových molekul ovlivněná 2 μ M (IRS2-2), 5 μ M (IRS2-5) a 10 μ M IRS 2 (IRS2-10). AA (arachidonová kyselina v koncentraci 1000 μ g/ml).

Koncentrace 2 μ M a 5 μ M IRS 2 nezpůsobily změnu exprese povrchových molekul oproti aktivaci arachidonovou kyselinou, nicméně nejvyšší 10 μ M koncentrace vedla ke zvýšení ve všech sledovaných molekulách (Obr. 21).



Obr. 22: Expressie povrchových molekul ovlivněná 2 μ M (IRS5-2), 5 μ M (IRS5-5) a 10 μ M IRS 5 (IRS5-10). AA (arachidonová kyselina v koncentraci 1000 μ g/ml).

U všech sledovaných molekul způsobily všechny testované koncentrace IRS5 mírný nárůst (Obr. 22).

4.3. Koagulační testy

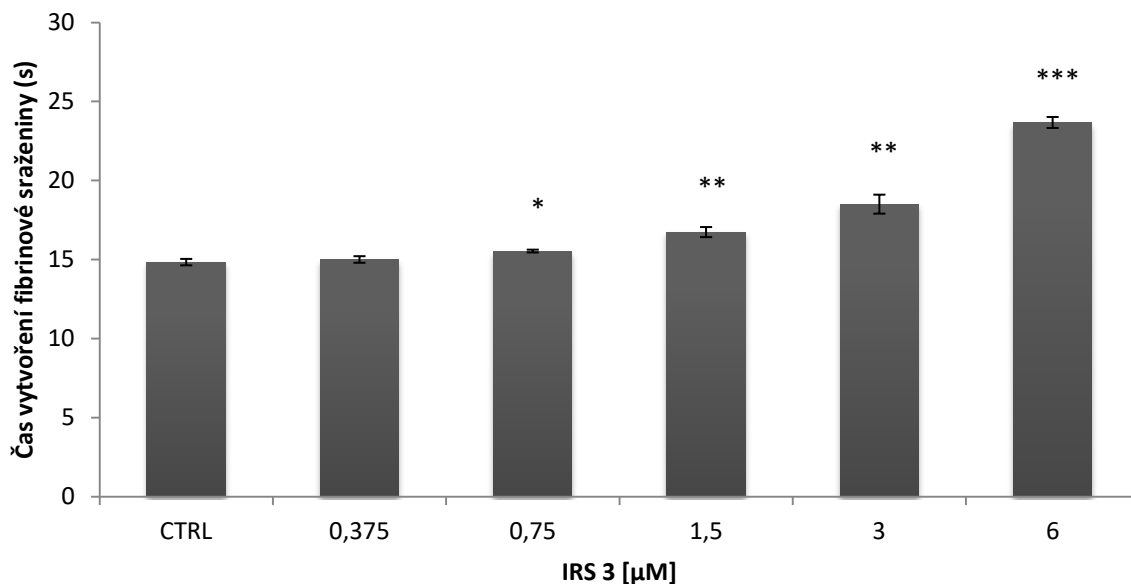
4.3.1. Protrombinový čas (PT)

Zprvu jsem otestovala vliv 6 μ M serpinů na protrombinový čas. Výsledky jsou uvedeny v Tab. IV.

Tab. IV: Efekt 6 μ M serpinů na PT.

Vzorek	Čas (s)
Kontrolní plazma	15,3
IRS 2	15,3
IRS 3	22,9
IRS 5	16,2
IRS 8	16,7

Kontrolní plazma a IRS 2 měly PT ve fyziologických hodnotách, IRS 5 a IRS 8 prodloužily čas srážení jen nepatrně, ale IRS 3 vedl k prodloužení protrombinového času o 7,6 s. Proto jsem dále otestovala postupnou ředící řadu (viz Tab. III) u IRS 3. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 23.



Obr. 23: Vliv různých koncentrací IRS 3 na protrombinový čas. CTRL (kontrolní citrátová plazma).

U postupně vzrůstajících koncentrací IRS 3 byl pozorován plynulý nárůst inhibičního účinku, nejvyšší koncentrace prodloužila fyziologický PT o více jak 8 s.

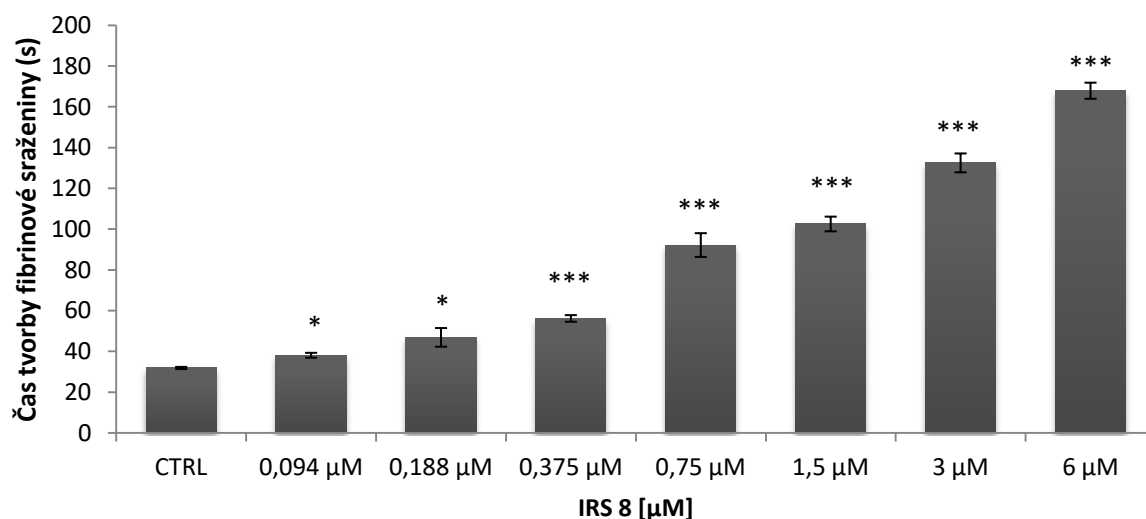
4.3.2. Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

Znovu jsem nejdříve otestovala vliv 6µM serpinů na aPTT (abychom věděli, který ze serpinů by na něj mohl mít určitý efekt). Výsledky tohoto orientačního pokusu jsou uvedeny v Tab. V.

Tab. V: Efekt 6 μ M serpinů na aPPT.

Vzorek	Čas (s)
Kontrolní plazma	31,1
IRS2	32,1
IRS3	32,6
IRS5	30,2
IRS8	168,1

U kontrolní plazmy, IRS 2, IRS 3 a IRS 5 bylo aPPT ve fyziologických hodnotách, IRS 8 vyvolal prodloužení času vytvoření krevní sraženiny více než 5x. Proto jsem od něj poté testovala postupnou ředící řadu (viz Tab. III). Výsledky tohoto pokusu jsou graficky zpracovány na Obr. 24.



Obr. 24: Vliv různých koncentrací [μM] IRS 8 na aktivovaný parciální tromboplastinový čas. CTRL (kontrolní citrátová plazma).

Všechny testované koncentrace IRS 8 vedly ke statisticky průkaznému prodloužení aPTT, nejvyšší 6 μ M koncentrace způsobila navýšení času srážení více než 4x oproti fyziologickým hodnotám.

4.3.3. Trombinový čas (TT)

U TT testu jsem otestovala vliv serpinů jen orientačně, jelikož žádný z testovaných inhibitorů neposunul trombinový čas mimo fyziologické rozmezí. Výsledky jsou poznamenány v Tab. VI.

Tab. VI: Efekt 6 μ M serpinů na TT.

Vzorek	Čas (s)
Kontrolní plazma	17,6
IRS2	19,9
IRS3	18,4
IRS5	20,5
IRS8	18,4

5. Diskuze

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.4., endogenní serpiny fungují jako fyziologické hemostatické regulátory (Pike a kol., 2005), nicméně klíšťata jejich obsah ve svých slinách využívají v rámci adaptace k hematofágnímu způsobu života (Francischetti, Ivo, 2009). Nás proto zajímalo, jakým způsobem tyto exogenní serpiny ovlivní hostitelskou hemostázu.

Protože v době, kdy jsem začínala s prací v laboratoři, nebyl na Katedře medicínské biologie dostupný ani agregometr ani koagulometr, přistoupila jsme k testování agregace krevních destiček pomocí metody založené na průtokové cytometrii (De Cuyper a kol., 2013). Postup mých pokusů sice vycházel z této publikace, ale jelikož jsem měla problémy s aktivací agregace, mírně jsme ho poupravili a snažili se tuto metodu optimalizovat tak, aby výsledky byly konzistentní.

Stejně jako De Cuyper a kol. jsem k aktivaci agregace používala kolagen a PMA. De Cuyper a kol. byli schopni v jejich pokusech dosáhnout u vzorků inkubovaných s PMA přibližně 20% zastoupení dvojitě pozitivních agregátů, v případě kolagenu přibližně 15% nárůstu agregátů, přičemž jejich kontrolní vzorky byly naprosto minimálně agregovány, zhruba kolem 1 %. Přestože já jsem ve svých pokusech byla při použití stejných koncentrací aktivátorů schopna dosáhnout v případě PMA zastoupení agregátů převyšujících 20 %, nepodařilo se mi minimalizovat agregaci u kontrolních vzorků, která v naprosté většině případů převyšovala 10 %, tudíž při zohlednění procentuálního nárůstu agregovaných krevních destiček mezi kontrolními a aktivovanými vzorky, se mi nepodařilo dosáhnout více jak 14% zastoupení agregátů. Pomocí kolagenu se mi nepovedlo agregaci aktivovat vůbec.

Velmi agregované kontroly v mých pokusech zřejmě spočívají v odlišném způsobu odběru krve (zatímco já jsem odebírala krev z ramenního pletence, v citovaném článku odebírali krev z orbitální oblasti, tváře nebo srdce), dalším determinujícím faktorem mohla být rychlost odběru a přepipetování krve do zkumavky s citrátem (krev se totiž začíná srážet ihned po poškození cévní stěny a manipulace pravděpodobně nebyla dostatečně rychlá na to, aby bylo procento agregátů nižší).

Kámen úrazu byla optimalizace koncentrací jednotlivých aktivátorů. Aktivace agregace pomocí PMA dle De Cuyper a kol. mi postupně přestala fungovat a kolagen, který ve zmíněné publikaci používali v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ (De Cuyper a kol., 2013), nefungoval v mém případě vůbec. Jelikož jsem s jejich metodikou, kterou jsem se řídila zpočátku, narazila na úskalí, začala jsem pátrat po dalších možnostech. Po rozsáhlejším průzkumu

dalších publikací jsem narazila na články, kde se ke zvýšení agregace používaly nejrozličnější koncentrace kolagenu, arachidonové kyseliny či trombinu (Salmon, 1996; Walkowiak a Michalec, 1997; Peace a kol., 2008). V práci Peace a kol. dosahovali maximální agregace při použití kolagenu v koncentraci 190 $\mu\text{g/ml}$ a arachidonové kyseliny v koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ (Peace a kol., 2008). Právě tímto článkem jsem se inspirovala při úpravě metodického postupu testování agregace. Arachidonová kyselina sice nezpůsobovala pozorovatelné změny na forward a sice scatter, ale vyšší koncentrace kolagenu viditelně zafungovala, přestože jsem nemohla výsledky vyhodnotit. To jsem považovala za malý dílčí úspěch v optimalizaci aktivátorů.

Hlavní problém u testování agregace spočíval zajisté v nekonzistentních výsledcích (přestože jsem postupovala ve všech pokusech stejným způsobem, výsledky byly velmi variabilní) a ve splývání jednotlivých populací buněk v rámci forward (velikost) a side (granularita) scatter, kvůli kterým jsem nemohla výsledky hodnotit kvantitativně.

Jediný náznak inhibice agregace krevních destiček, kterého se mi podařilo dosáhnout, byl založen pouze na posunu doleva v rámci forward scatter (posun k menším velikostem, tedy teoreticky inhibice agregace krevních destiček), byl pozorován v případě IRS 2.

Přes veškerou snahu metodu optimalizovat tak, aby poskytovala reprodukovatelné výsledky, se nám nepodařilo zjistit příčinu výše zmiňovaných problémů. Na konci roku 2019, kdy byl na Katedře medicínské biologie pořízen agregometr, jsem zkusila otestovat agregaci trombocytů aktivovanou stejnými typy agonistů (PMA, kolagen a AA) i pomocí této metody. Agregometr by měl být mnohem citlivější, na provedení pokusu by mělo postačovat již 50 milionů destiček/ml, nicméně ani v tomto případě se mi nepodařilo agregaci aktivovat. Problém by tedy nemusel nutně tkvět v metodickém postupu, ale mohl by spočívat i v použitých chemikáliích nebo samotném způsobu izolace krevních destiček.

Agregaci trombocytů lze zkoumat i jinými metodami, např. s použitím 96-jamkové destičky, kdy se do jamek obsahujících agonisty napipetuje PRP a změří se absorbance světla (Krause a kol., 2001; Maayani a kol., 2001; Moran a kol., 2006; Armstrong a kol., 2008; Peace a kol., 2008; Mylotte a kol., 2011; Chan, Armstrong a Warner, 2018).

My jsme se ovšem rozhodli vydat jinou cestou. Pozorovatelné posuny v rámci forward a side scatter naznačovaly, že aktivátory možná nezpůsobují agregaci, ale nějaké změny u krevních destiček jednoznačně probíhají.

Právě proto jsem začala s testováním aktivace krevních destiček pomocí fluorescenčně značených protilátek proti povrchovým molekulám (Henn a kol., 2001; van Velzen a kol.,

2012; Saboor, Moinuddin a Ilyas, 2013). Aktivaci se mi již pomocí agonistů podařilo nastartovat úspěšně, vycházela jsem z koncentrací užívaných v agregačních testech (Peace a kol., 2008), ovšem koncentraci arachidonové kyseliny jsem zdvojnásobila. I zde byly výsledky nekonzistentní, aktivace při stejném postupu dopadla pokaždé jinak. Inhibiční účinky testovaných serpinů na trombocytární aktivaci pozorovány nebyly, a to ani u IRS 2, u kterého jsme během testování agregace zaznamenali posun k menším velikostem v rámci forward scatter.

Ke konci roku 2019 byl pořízen i koagulometr, pomocí kterého jsem zkoumala, jak testované serpiny ovlivňují koagulační kaskádu. V případě PT jsem pozorovala středně silný inhibiční účinek u IRS 3, u aPTT IRS 8 inhiboval vnitřní cestu koagulační kaskády velmi výrazně. TT nebyl posunut mimo fyziologické hodnoty žádným ze serpinů. To poukazuje na to, že testované serpiny inhibují funkci některých z faktorů vnitřní a vnější koagulační kaskády, nicméně na samotnou přeměnu fibrinogenu na fibrin vliv zřejmě nemají.

Když se zaměříme na serpiny, které působí jako fyziologické inhibitory koagulační kaskády, většina z nich působí na několik různých faktorů zároveň, z toho nejčastěji na trombin či faktory vnitřní koagulační kaskády (X nebo IX). Ukázkovým příkladem může být antitrombin, který inhibuje trombin a faktory IX, X, XI a XII, přičemž jeho antikoagulační aktivita závisí na přítomnosti kofaktoru (v jeho případě heparinu) (Rau a kol., 2007). Právě to spolu s faktem, že specificita serpinů z velké části závisí na kofaktorech, které ji mohou svou přítomností radikálně měnit, napovídá, že s velkou pravděpodobností i námi testované serpiny IRS 3 a IRS 8 mohou inhibovat více různých faktorů koagulační kaskády. Speciálně by to mohlo platit v případě IRS 8, u kterého jsem naměřila výrazné, v nejvyšší koncentraci až čtyřnásobné, prodloužení fyziologické délky tvorby koagula. V takovém případě by i u těchto serpinů mohly hrát důležitou roli kofaktory. Nejčastějším kofaktorem fyziologických serpinů bývá heparin, který se uplatňuje u velké části prostudovaných serpinů (Rau a kol., 2007), nicméně serpin dependentní antikoagulační aktivitu mohou mít i jiné polysacharidy (Glauser a kol., 2009).

Zajímavým faktem je, že požadavky na antikoagulační léčbu využívanou v běžné lékařské praxi představují dvounásobné až čtyřnásobné prodloužení aPTT, přičemž mně se u 6 μ M koncentrace IRS 8 podařilo dosáhnout antikoagulačního účinku stejných kvalit.

6. Závěr

Snažila jsem se zavést a optimalizovat metodu testování agregace krevních destiček pomocí průtokové cytometrie, nicméně tohoto cíle se mi nepodařilo dosáhnout z důvodu nekonzistentní aktivace agregace krevních destiček, kvůli které nebylo možno výsledky hodnotit kvantitativně. Z tohoto důvodu jsem nemohla vyvozovat úvahy o inhibičních účincích testovaných serpinů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* na trombocytární agregaci.

Využití průtokové cytometrie se ukázalo být vhodnějším pro testování aktivace krevních destiček, kde se mi sice nepodařilo dosáhnout plně konzistentních výsledků, nicméně jsem již byla schopná testovat jednotlivé serpiny. Naše výsledky poukazují na to, že ani jeden z použitých serpinů zřejmě nemá inhibiční účinky na trombocytární aktivaci.

Podle očekávání se potvrdily antikoagulační účinky serpinů. IRS 3 mírně inhibuje vnější koagulační kaskádu, IRS 8 poté velmi výrazně vnitřní koagulační kaskádu.

7. Seznam citované literatury

De Abajo, F. J. (2011) 'Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet function: Mechanisms, clinical outcomes and implications for use in elderly patients', *Drugs and Aging*, 28(5), pp. 345–367. doi: 10.2165/11589340-000000000-00000.

André, P. et al. (2002) 'Platelet-derived CD40L: The switch-hitting player of cardiovascular disease', *Circulation*, 106(8), pp. 896–899. doi: 10.1161/01.CIR.0000028962.04520.01.

Armstrong, P. C. J. et al. (2008) 'Aspirin and the in vitro linear relationship between thromboxane A₂-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A₂', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(11), pp. 1933–1943. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03133.x.

Bennett, J. S. (2005) 'Structure and function of the platelet integrin IIb 3', *Journal of Clinical Investigation*, 115(12), pp. 3363–3369. doi: 10.1172/JCI26989.

Bombeli, T. and Spahn, D. R. (2004) 'Updates in perioperative coagulation: Physiology and management of thromboembolism and haemorrhage', *British Journal of Anaesthesia*. *British Journal of Anaesthesia*, 93(2), pp. 275–287. doi: 10.1093/bja/ae174.

Cardinal, D. C. and Flower, R. J. (1980) 'The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood', *Journal of Pharmacological Methods*, 3(2), pp. 135–158. doi: 10.1016/0160-5402(80)90024-8.

Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K. A. (2005) 'Molecular mechanisms of fibrinolysis', *British Journal of Haematology*, 129(3), pp. 307–321. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.

Chan, M. V., Armstrong, P. C. and Warner, T. D. (2018) '96-Well Plate-Based Aggregometry', *Platelets*. Taylor & Francis, 29(7), pp. 650–655. doi: 10.1080/09537104.2018.1445838.

Charafeddine, A. H. et al. (2012) 'Platelet-derived CD154: Ultrastructural localization and clinical correlation in organ transplantation', *American Journal of Transplantation*. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04241.x.

Chmelař, J. et al. (2017) 'Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. doi: 10.3389/fcimb.2017.00216.

Curvers, J. et al. (2008) 'Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: A multicenter optimization and standardization effort', *Transfusion*, 48(7), pp. 1439–1446. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01738.x.

De Cuyper, I. M. et al. (2013) 'A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay', *Blood*, 121(10), pp. e70–e80. doi: 10.1182/blood-2012-06-437723.

Dewitte, A. et al. (2015) ‘New frontiers for platelet CD154’, *Experimental Hematology and Oncology*, 4(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s40164-015-0001-6.

Ezihe-Ejiofor, J. A. and Hutchinson, N. (2013) ‘Anticlotting mechanisms 1: Physiology and pathology’, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, 13(3), pp. 87–92. doi: 10.1093/bjaceaccp/mks061.

Francischetti, Ivo, M. (2009) ‘The role of saliva in tick feeding’, *Frontiers in Bioscience*. NIH Public Access, Volume(14), p. 2051. doi: 10.2741/3363.

Furie, B., Furie, B. C. and Flaumenhaft, R. (2001) ‘A journey with platelet P-selectin: The molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion’, *Thrombosis and Haemostasis*, 86(1), pp. 214–221. doi: 10.1055/s-0037-1616219.

George, J. N. (2000) ‘Platelets’, *Lancet*, 355(9214), pp. 1531–9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02175-9.

Glauser, B. et al. (2009) ‘Anticoagulant activity of a sulfated galactan: Serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa’, *Thrombosis and Haemostasis*, 102(12), pp. 1183–1193. doi: 10.1160/TH09-04-0273.

Grigoryev, S. A. and Woodcock, C. L. (1998) ‘Chromatin Structure in Granulocytes’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), pp. 3082–3089. doi: 10.1074/jbc.273.5.3082.

Hankey, G. J. and Eikelboom, J. W. (2006) ‘Aspirin resistance’, *The Lancet*, 367(9510), pp. 606–617. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68040-9.

Henn, V. et al. (1998) ‘CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells’, *Nature*, 391(6667), pp. 591–594. doi: 10.1038/35393.

Henn, V. et al. (2001) ‘The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40’, *Blood*, 98(4), pp. 1047–1054. doi: 10.1182/blood.V98.4.1047.

Irving, J. A., Pike, R. N., et al. (2002) ‘Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: Engineering α 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases’, *Biochemistry*, 41(15), pp. 4998–5004. doi: 10.1021/bi0159985.

Irving, J. A., Shushanov, S. S., et al. (2002) ‘Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), pp. 13192–13201. doi: 10.1074/jbc.M108460200.

Jackson, S. P., Nesbitt, W. S. and Kulkarni, S. (2003) ‘Signaling events underlying thrombus formation’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), pp. 1602–1612. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00267.x.

Kamath, S., Blann, A. D. and Lip, G. Y. H. (2001) ‘Platelet Activation: Assessment and Quantification’, *European Heart Journal*, 22(17), pp. 1561–1571. doi: 10.1053/euhj.2000.2515.

Kamykowski, J. et al. (2011) ‘Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet α -granules’, *Blood*, 118(5), pp. 1370–1373. doi: 10.1182/blood-2011-01-330910.

Kieffer, N. and Phillips, D. R. (1990) ‘Platelet Membrane Glycoproteins: Functions in Cellular Interactions’, *Annual Review of Cell Biology*, 6(1), pp. 329–357. doi: 10.1146/annurev.cb.06.110190.001553.

Kittnar, O. a kol. (2011) *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada.

Koltai, K. et al. (2017) ‘Platelet aggregometry testing: Molecular mechanisms, techniques and clinical implications’, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), pp. 1–21. doi: 10.3390/ijms18081803.

Krause, S. et al. (2001) ‘Monitoring the effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists with a microtiter plate method for detection of platelet aggregation’, *Platelets*, 12(7), pp. 423–430. doi: 10.1080/09537100120071040.

Lasne, D., Jude, B. and Susen, S. (2006) ‘From normal to pathological hemostasis’, *Canadian Journal of Anesthesia*, 53(6 SUPPL.), pp. 2–11. doi: 10.1007/BF03022247.

Law, R. H. P. et al. (2006) ‘An overview of the serpin superfamily’, *Genome Biology*, 7(5), pp. 1–11. doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.

Levy, J. H. et al. (2014) ‘Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: A review of the literature and current guidelines for testing’, *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(3), pp. 453–477. doi: 10.1016/j.cll.2014.06.005.

Leytin, V. et al. (2000) ‘Flow cytometric parameters for characterizing platelet activation by measuring P-selectin (CD62) expression: Theoretical consideration and evaluation in thrombin-treated platelet populations’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(1), pp. 85–90. doi: 10.1006/bbrc.2000.2255.

Leytin, V. et al. (2004) ‘Role of platelet surface glycoprotein Iba and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates’, *Transfusion*, 44(10), pp. 1487–1495. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.04042.x.

Ligoxygakis, P., Roth, S. and Reichhart, J.-M. (2003) ‘A Serpin Regulates Dorsal-Ventral Axis Formation in the Drosophila Embryo’, *Current Biology*, 13(23), pp. 2097–2102. doi: 10.1016/j.cub.2003.10.062.

Linden, M. D. et al. (2004) ‘Application of flow cytometry to platelet disorders’, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 30(5), pp. 501–511. doi: 10.1055/s-2004-835671.

Maayani, S. et al. (2001) ‘Activation of Gi-coupled receptors releases a tonic state of inhibited platelet aggregation’, *Platelets*, 12(2), pp. 94–98. doi: 10.1080/09537100020032055.

Moran, N. et al. (2006) ‘Monitoring modulators of platelet aggregation in a microtiter plate assay’, *Analytical Biochemistry*, 357(1), pp. 77–84. doi: 10.1016/j.ab.2006.06.037.

Mylotte, D. et al. (2011) ‘Clopidogrel discontinuation and platelet reactivity following coronary stenting’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(1), pp. 24–32. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04121.x.

Nagata, K. (1996) ‘Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone’, *Trends in Biochemical Sciences*, 21(1), pp. 23–26. doi: 10.1016/S0968-0004(06)80023-X.

Nieswandt, B. and Watson, S. P. (2003) ‘Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor?’, *Blood*, 102(2), pp. 449–461. doi: 10.1182/blood-2002-12-3882.

Nishibori, M. et al. (1993) ‘The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with hermannsky-pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin’, *Journal of Clinical Investigation*, 91(4), pp. 1775–1782. doi: 10.1172/JCI116388.

Offermanns, S. (2006) ‘Activation of platelet function through G protein-coupled receptors’, *Circulation Research*, 99(12), pp. 1293–1304. doi: 10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.

Olson, S. T. et al. (2001) ‘Resolution of Michaelis complex, acylation, and conformational change steps in the reactions of the serpin, plasminogen activator inhibitor-1, with tissue plasminogen activator and trypsin’, *Biochemistry*, 40(39), pp. 11742–11756. doi: 10.1021/bi0107290.

Opal, S. M. et al. (2002) ‘Antithrombin, heparin, and heparan sulfate’, *Critical Care Medicine*, 30(5 SUPPL.), pp. 325–331. doi: 10.1097/00003246-200205001-00024.

Owens, A. P. and Mackman, N. (2010) ‘Tissue factor and thrombosis: The clot starts here’, *Thrombosis and Haemostasis*, 104(09), pp. 432–439. doi: 10.1160/TH09-11-0771.

Palta, S., Saroa, R. and Palta, A. (2014) ‘Overview of the coagulation system’, *Indian Journal of Anaesthesia*, 58(5), pp. 515–523. doi: 10.4103/0019-5049.144643.

Peace, A. J. et al. (2008) ‘Dual antiplatelet therapy unmasks distinct platelet reactivity in patients with coronary artery disease’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(12), pp. 2027–2034. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03157.x.

Pemberton, P. A. et al. (1988) ‘Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation’, *Nature*, 336(6196), pp. 257–258. doi: 10.1038/336257a0.

Pike, R. N. et al. (2005) ‘Control of the coagulation system by serpins’, *FEBS Journal*, 272(19), pp. 4842–4851. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04880.x.

Pols, M. S. and Klumperman, J. (2009) ‘Trafficking and function of the tetraspanin CD63’, *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 315(9), pp. 1584–1592. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.

Previtali, E. et al. (2011) ‘Risk factors for venous and arterial thrombosis’, *Blood Transfusion*, 9(2), pp. 120–138. doi: 10.2450/2010.0066-10.

Pusch, G. et al. (2008) ‘Aspirin resistance: Focus on clinical endpoints’, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 52(6), pp. 475–484. doi: 10.1097/FJC.0b013e31818eee5f.

Ratnikov, B. I., Partridge, A. W. and Ginsberg, M. H. (2005) ‘Integrin activation by talin’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), pp. 1783–1790. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01362.x.

Rau, J. C. et al. (2007) ‘Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), pp. 102–115. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02516.x.

Ray, C. A. et al. (1992) ‘Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme’, *Cell*, 69(4), pp. 597–604. doi: 10.1016/0092-8674(92)90223-Y.

Ribeiro, J. M. C. and Francischetti, I. M. B. (2003) ‘Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives’, *Annual Review of Entomology*, 48(1), pp. 73–88. doi: 10.1146/annurev.ento.48.060402.102812.

Rountree, K. M. and Lopez, P. P. (2020) *Partial Thromboplastin Time*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507772/#!po=90.0000>.

Ruf, A. and Patscheke, H. (1995) ‘Flow cytometric detection of activated platelets: Comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression’, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 21(2), pp. 146–151. doi: 10.1055/s-2007-1000389.

Ruggeri, Z. M. (2002) ‘Platelets in atherothrombosis’, *Nature Medicine*, 8(11), pp. 1227–1234. doi: 10.1038/nm1102-1227.

Ruggeri, Z. M. (2003) ‘Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions’, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), pp. 1335–1342. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00260.x.

Saboor, M., Moinuddin, M. and Ilyas, S. (2013) ‘New horizons in platelets flow cytometry’, *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 20(2), pp. 62–66.

Salmon, D. M. (1996) ‘Optimisation of platelet aggregometry utilising microtitreplate technology and integrated software’, *Thrombosis Research*, 84(3), pp. 213–216. doi: 10.1016/0049-3848(96)00179-X.

Schick, C. et al. (1998) ‘Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: A kinetic analysis’, *Biochemistry*, 37(15), pp. 5258–5266. doi: 10.1021/bi972521d.

Schönbeck, U. and Libby, P. (2001) ‘The CD40/CD154 receptor/ligand dyad’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(1), pp. 4–43. doi: 10.1007/PL00000776.

Shattil, S. J. and Newman, P. J. (2004) ‘Integrins: Dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets’, *Blood*, 104(6), pp. 1606–1615. doi: 10.1182/blood-2004-04-1257.

Silverman, G. A. et al. (2001) ‘The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins’, *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp. 33293–33296. doi: 10.1074/jbc.R100016200.

Sonmez, O. and Sonmez, M. (2017) ‘Role of platelets in immune system and inflammation’, *Porto Biomedical Journal*, 2(6), pp. 311–314. doi: 10.1016/j.pbj.2017.05.005.

Tadokoro, S. et al. (2003) ‘Talin binding to integrin β tails: A final common step in integrin activation’, *Science*, 302(5642), pp. 103–106. doi: 10.1126/science.1086652.

Teruya, J. and Kostousov, V. (2014) *Thrombin Time*. Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/2086278-overview>.

Tollefsen, D. M. (2007) ‘Heparin Cofactor II Modulates the Response to Vascular Injury’, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(3), pp. 454–460. doi: 10.1161/01.ATV.0000256471.22437.88.

Triplett, D. A. (2000) ‘Coagulation and bleeding disorders: Review and update’, *Clinical Chemistry*, 46(8 II), pp. 1260–1269. doi: 10.1093/clinchem/46.8.1260.

Vaughan, D. E. (2001) ‘Angiotensin, fibrinolysis, and vascular homeostasis’, *The American Journal of Cardiology*, 87(8), pp. 18–24. doi: 10.1016/S0002-9149(01)01509-0.

van Velzen, J. F. et al. (2012) ‘Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers.’, *Thrombosis research*. Elsevier, 130(1), pp. 92–8. doi: 10.1016/j.thromres.2012.02.041.

Walkowiak, B. and Michalec, L. (1997) ‘Microplate Reader - a Convenient Tool in Studies of Blood Coagulation’, *Thrombosis Research*, 87(I), pp. 95–103.

Yang, R. and Moosavi, L. (2019) *Prothrombin Time*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544269/#!po=91.6667>.

Zou, Z. et al. (1994) ‘Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells’, *Science*, 263(5146), pp. 526–529. doi: 10.1126/science.8290962.