

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd**

# **Role erytrocytů při hemostáze**

**Bakalářská práce**

**Autor:** Petra Fukasová

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2017**

**University of Pardubice**  
**Faculty of Chemical Technology**  
**Department of Biological and Biochemical Sciences**

# **Role of red blood cells in haemostasis**

**Bachelor thesis**

**Author:** Petra Fukasová

**Supervisor:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2017**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Fukasová**  
Osobní číslo: **C14263**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Role erytrocytů při hemostáze**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Zpracujte literární rešerši zaměřenou na tematiku funkce erytrocytů, a to speciálně ve vztahu k roli v hemostáze. V kompilační práci se nejprve zaměřte na obecný popis funkcí a struktury erytrocytů. Následně detailněji popište strukturu erytrocytární membrány, přehled a funkci jednotlivých biomolekul. V neposlední řadě také popište možné změny tvarů erytrocytů, ke kterým během aktivované hemokoagulace a hemostázy v erytrocytech dochází.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

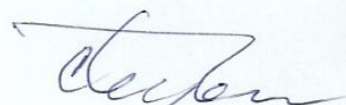
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

Petra Fukasová

**Poděkování:**

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph. D. za zadání zajímavého tématu, velmi vstřícný přístup, podporu a cenné rady, které mi poskytl během psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a motivaci ke studiu.

## **ANOTACE**

Tato práce je věnována působení erytrocytů v hemostáze. Zabývá se jak obecným popisem erytrocytu, tak podrobnějším popisem hemostázy. Dále je zde možné zjistit informace o membráně erytrocytu a zastoupení jednotlivých bílkovin v membráně a detailní popis role červených krvinek v zástavě krvácení.

### **Klíčová slova**

Hemostáza, erytrocyt, membrána erytrocytu, polyhedrocyt

## **ANNOTATION**

This bachelor work is focused on description of a role of red blood cells in haemostasis. It deals with basic description of erythrocyte and more detailed description of haemostasis. In addition, other information can be found out about erythrocyte membrane with its components and detailed role of erythrocytes in haemostasis.

### **Key words**

Haemostasis, red blood cell, erythrocyte membrane, polyhedrocyte



# OBSAH

ÚVOD .....	13
1. HEMOSTÁZA.....	14
1.1 Reakce cév .....	14
1.2 Činnost trombocytů .....	14
1.3 Hemokoagulace.....	15
1.3.1 Koagulační kaskáda.....	16
1.3.1.1 Iniclace .....	18
1.3.1.2 Amplifikace .....	19
1.3.1.3 Propagace .....	19
2. ČERVENÉ KRVINKY.....	20
2.1 Erytropoéza .....	20
2.2 Membrána červených krvinek.....	20
2.2.1 Membránové lipidy .....	21
2.2.2 Membránové proteiny .....	22
2.2.3 Periferní membránové proteiny.....	23
2.2.3.1 Spektrin .....	23
2.2.3.2 Ankyrin.....	24
2.2.3.3 Protein 4.1 .....	25
2.2.3.4 Protein 4.2 .....	26
2.2.3.5 Aktin.....	26
2.2.4 Integrální membránové proteiny .....	28
2.2.4.1 Proužek 3.....	28
2.2.4.2 Glykoforiny a aquaporiny .....	28
3. PŮSOBENÍ ERYTROCYTŮ V HEMOSTÁZE.....	29
3.1 Reologická funkce.....	29
3.2 Mezibuněčné interakce.....	31

3.2.1	Adhezní receptory .....	32
3.2.1.1	VLA-4 .....	32
3.2.1.2	VCAM-1 – Vascular Cell Adhesion Molecule 1 .....	33
3.2.1.3	Lutheran Basal Cell Adhesion Molecule – Lu/B-CAM.....	33
3.2.1.4	Laminin .....	34
3.2.1.5	ICAM-4 –IntraCellular Adhesion Molecule 4 .....	34
3.2.2	Interakce červených krvinek s trombocyty .....	35
3.2.3	Interakce červených krvinek s endotelem .....	36
3.3	Vliv erytrocytů na tvorbu sraženin.....	37
3.3.1	Fosfatidylserin a jeho vliv na krevní srážení.....	39
3.3.2	Vliv mikročástic na koagulaci.....	40
3.3.3	Hemolýza a její vliv na koagulaci .....	40
4.	ZÁVĚR .....	42
5.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	43

## SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Krevní destička s pseudopodiemi v elektronovém mikroskopu.....	15
Obrázek 2: Schéma hemokoagulace .....	17
Obrázek 3: Nový model hemokoagulace skládající se ze tří fází .....	18
Obrázek 4: Nový model hemokoagulace .....	19
Obrázek 5: Struktura membrány erytrocytu.....	21
Obrázek 6: Asymetrické rozložení fosfolipidů v buněčné membráně .....	22
Obrázek 7: Elektroforéza membránových proteinů erytrocytu.....	23
Obrázek 8: Funkční domény ankyrinu.....	24
Obrázek 9: Funkční domény proteinu 4.1 .....	25
Obrázek 10: Tvorba a struktura aktinových filamen .....	27
Obrázek 11: Adhezivní interakce RBC s endotelem .....	35
Obrázek 12: Struktura krevních sraženin). .....	38

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	aminokyselina
AQP	aquaporin
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
CTD	C-terminální konec ( <i>Carboxyl Terminal Domain</i> )
FBC	fibronektin
FERM	<i>Four. One protein, Ezrin, Radixi, Moesin</i>
GPA	glykoforin A
GPB	glykoforin B
GPC	glykoforin C
ICAM-4	<i>IntraCellular Adhesion Molecule 4</i>
LAM	laminin
Lu/BCAM	<i>Lutheran Basal Cell Adhesion Molecule</i>
NO	oxid dusnatý
RAGE	<i>Receptors Advanced Glycation End</i>
RIFINS	<i>Repetitive Intersperse Families of polypeptides</i>
SABD	<i>Spectrin-Actin Binding Domain</i>
TF	tkáňový faktor
TSP	trombospondin
ULvWF	<i>Ultra-Large von Willeband Facto</i>

# ÚVOD

Hemostáza či zástava krvácení je pro živé organismy životně důležitý děj. Celý proces je složen z několika po sobě jdoucích reakcí a při poruše jedné z nich mohou nastat závažné změny. Cílem správné hemostázy je vytvoření fibrinu. To se děje pomocí koagulační kaskády, která je založena na postupné aktivaci koagulačních faktorů.

Mezi nejhlavnější funkce červených krvinek patří přenos dýchacích plynů a zásobení tkání kyslíkem. Ovšem vliv erytrocytů na hemostázu patří k novějším tématům vedle činnosti krevních destiček, která je známá již dlouhou dobu. V posledních několika letech se ukázalo, že červené krvinky mají biologický a klinický význam při krevním srážení a tím i u jeho poruch. Způsob, jakým erytrocyty ovlivňují hemostázu, tkví ve vlastnostech jejich buněčné membrány, přítomností adhezivních molekul na jejich povrchu a schopností měnit svůj tvar během krevního srážení.

# 1. HEMOSTÁZA

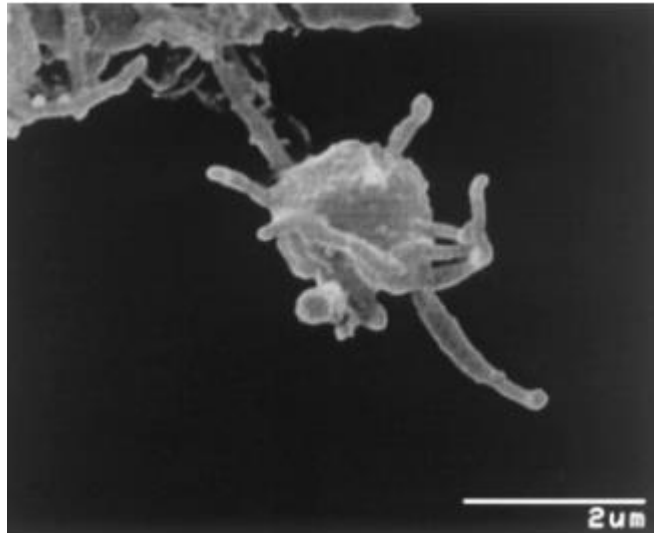
Hemostáza je děj, při kterém dochází k zastavení krvácení, pokud se naruší cévní stěna. Tento proces je pro živý organismus velice důležitý a chrání ho před větší ztrátou krve či dokonce vykrvácením při poranění. Mezi mechanismy, díky kterým dochází k hemostáze, jsou: reakce cév, činnost trombocytů, hemokoagulace a fibrinolýza. Jako první se hemostatické děje uplatňují na malé trhliny stěn kapilár a žilek. Pokud ovšem dojde k poškození velké tepny, kde je krev pod vyšším tlakem, nestačí k zástavě krvácení běžné přirozené procesy. V tomto případě je nutné, aby byl raněný odborně ošetřen, jinak by mohlo dojít k vykrvácení.

## 1.1 Reakce cév

Ihned po poranění cévní stěny dojde ke stažení hladké svaloviny, čímž se okamžitě sníží průtok krve. Tuto vazokonstrikci způsobí uvolnění vazokonstrikčních látek, jako je tromboxan  $A_2$  (Guyton a Hall, 2006). Ten hraje důležitou roli v aktivaci krevních destiček dále v jejich změně tvaru a agregaci, což má za výsledek tvorbu trombu. Trombus vytvořený pomocí tromboxanu  $A_2$  agregací krevních destiček, může někdy způsobit akutní infarkt myokardu. Prevencí tohoto onemocnění je tvorba inhibitorů tromboxanu  $A_2$  a antagonistů tkáňového faktoru (Nakahata, 2008).

## 1.2 Činnost trombocytů

Trombocyty jsou malé bezjaderné buňky, které mají v průměru přibližně 1-2  $\mu\text{m}$  (Hou a Carimm et al., 2012). Jsou vytvářeny z megakaryocytů v kostní dřeni a po jejich uvolnění do krevního oběhu hrají klíčovou roli v hemostáze. Mohou se velice rychle adherovat a agregovat na místě, kde byla céva poškozena a tím pomáhat při její opravě (Wang, Andrews a Yang et al., 2012). Pomocí von Willebrandova faktoru a hlavního proteinu subendotelového pojiva, kolagenu, dojde k adhezi trombocytů. Tato adheze je počátečním krokem primární hemostázy a díky ní dochází k aktivaci krevních destiček a následné změně jejich tvaru, kdy se začnou tvořit z membrány tzv. pseudopodie (obr. 1). Aktivace je spojena s vazbou fibrinogenu na hlavní receptor GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin), tím dojde k následné agregaci krevních destiček. Agregace je charakterizována shlukováním destiček do hemostatické zátky (Jurk a Kehrel, 2005).



Obrázek 1: Krevní destička s pseudopodiemi v elektronovém mikroskopu (převzato z Jurk a Kehrel, 2005)

### 1.3 Hemokoagulace

Po reakci cév a následné činnosti trombocytů nastává hemokoagulace. U zdravého jedince koluje krev v těle jako kapalina, nicméně při poranění cév je nutné přeměnit rozpustný fibrinogen na nerozpustný fibrin. Tato přeměna je zprostředkována plazmatickými koagulačními proteiny. Většina koagulačních faktorů je syntetizována v játrech a jsou prekurzory proteolytických enzymů, známé jako zymogeny – což jsou neaktivní formy těchto enzymů. (Palta S, Palta A. a Saroa, 2014). Výčet koagulačních faktorů je uveden v tabulce 1.

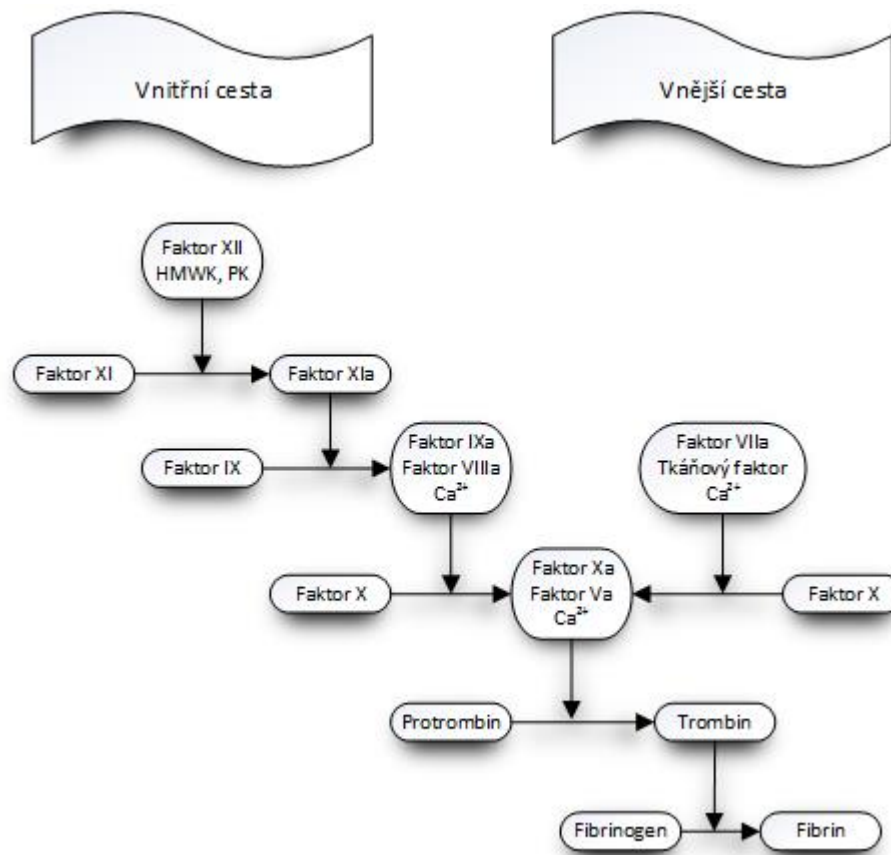
Tabulka 1: Výčet koagulačních faktorů

Faktor číslo	Název faktoru
I	Fibrinogen
II	Protrombin
III	Tkáňový tromboplastin
IV	Ca <sup>2+</sup> ionty
V	Proakcelerin
VII	Prokonvertin
VIII	Antihemofilický faktor
IX	Christmasův faktor
X	Stuar-Prowerův faktor
XI	Plasma Thromboplastin Antecedent
XII	Hagemanův faktor
XIII	Fibrin stabilizující faktor

### 1.3.1 Koagulační kaskáda

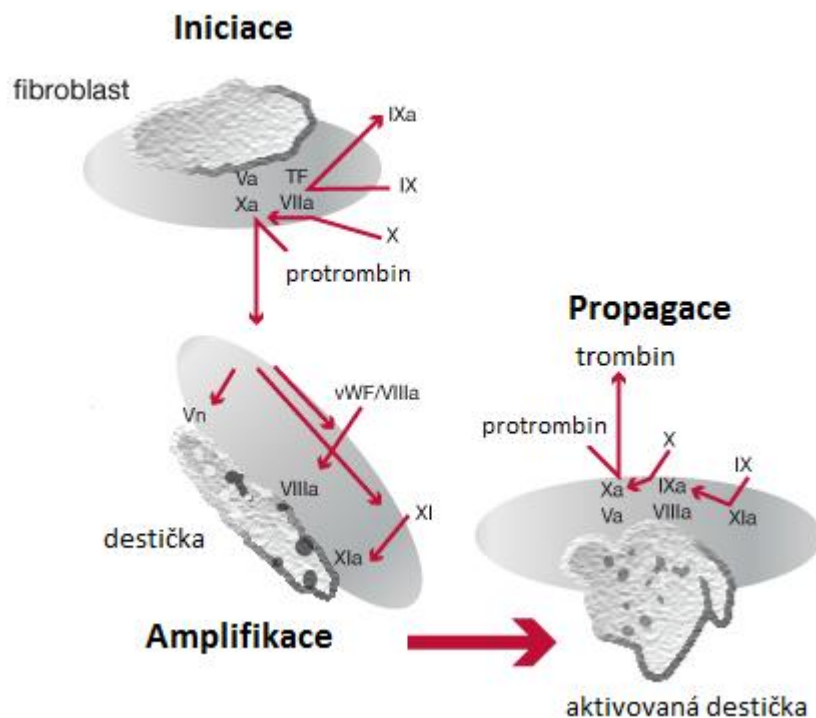
Koagulační kaskáda byla velkým pokrokem v porozumění procesu koagulace. Poté, co bylo zjištěno více o biochemii a především koagulačních faktorech, vytvořil se model koagulace (obr. 2). Tento model je založený na rozdílné aktivaci systémů, které se rozdělují na vnitřní a vnější. Vnější cesta je aktivována přítomností tkáňového faktoru, zatímco vnitřní cesta se aktivuje v případě, že dojde ke kontaktu krve s negativně nabitým povrchem, což má za následek aktivaci faktoru VII (*Ferreira et al., 2010*).





Obrázek 2: Schéma hemokoagulace: Znárodnění aktivace jednotlivých koagulačních faktorů: Aktivovaný faktor je označen písmenem „a“ (upraveno dle Hoffman a Monroe, 2001)

Tento model hemokoagulace je již zastaralý a navazuje na něj model nový (obr. 3), který vychází z modelu původního, a skládá se ze tří fází – iniciace, amplifikace a propagace (Hoffman a Monroe, 2001), a je založen na roli jednotlivých buněk (Smith, 2009).



Obrázek 3: Nový model hemokoagulace skládající se ze tří fází: První fází je iniciace, probíhající na buňce nesoucí tkáňový faktor. Dále amplifikace a aktivace krevních destiček. Třetí fáze – propagace, která probíhá na aktivovaném povrchu krevních destiček (převzato z Hoffman a Monroe, 2001)

### 1.3.1.1 Iniciace

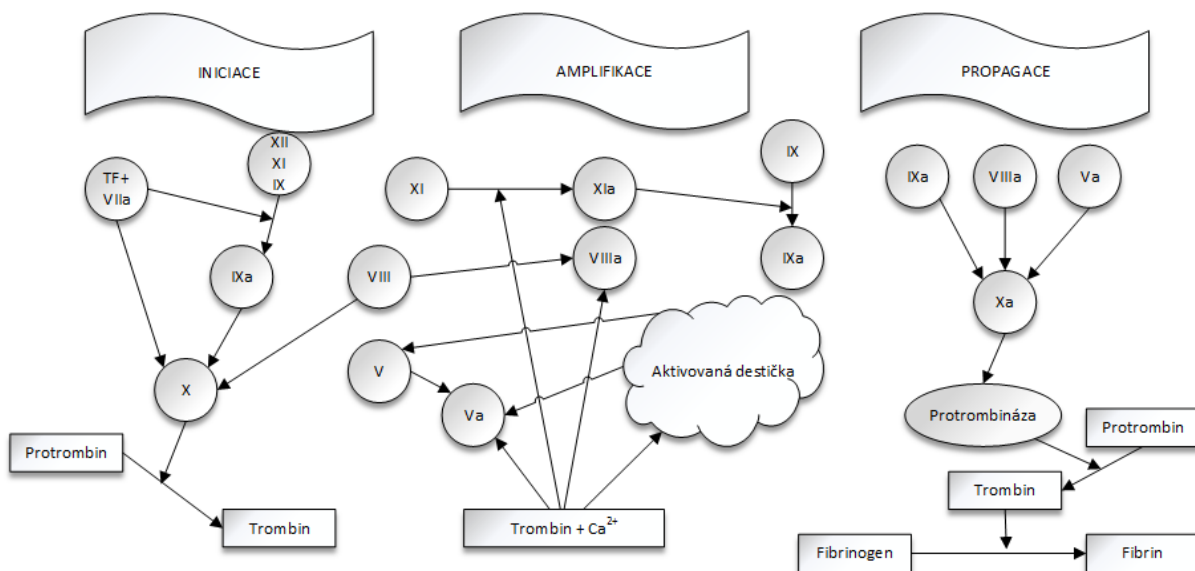
Iniciační fáze koagulace je zahájena na buňkách nesoucí tkáňový faktor (TF), jako je například fibroblast (Hoffman, 2003). Během hemostázy umožňuje narušení cévy kontakt mezi plazmou a buňkami nesoucími TF. Faktor VII v plazmě se pevně váže na buněčný TF a je rychle aktivován koagulačními a nekoagulačními proteázami. Komplex FVIIa/TF aktivuje faktor X a faktor IX. Aktivovaný FXa může aktivovat plazmatický faktor V, stejně tak jako nekoagulační proteázy. Pokud faktor X, aktivovaný komplexem FVIIa/TF, opustí chráněné prostředí na povrchu, je rychle inhibován TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) nebo ATIII (*AntiThrombin*). Nicméně, faktor Xa, který zůstává na povrchu buňky, se může spojit s faktorem Va a tím dojde k vytvoření malého množství trombinu. Ten následně hraje důležitou roli v následující aktivaci krevních destiček a faktoru VIII během amplifikační fáze (Hoffman a Monroe, 2001).

### 1.3.1.2 Amplifikace

V této fázi se malé množství trombinu vytvořeného v iniciační fázi šíří z buňky nesoucí TF a je k dispozici pro aktivaci krevních destiček, které unikly z cév v místě poranění. Navázání trombinu na povrchové receptory krevních destiček způsobí velké změny na jejich povrchu. Výsledkem je změna tvaru a proměna membránových fosfolipidů, čímž se vytvoří prokoagulační povrch na membráně buňky. Kromě aktivace destiček, trombin získaný v iniciační fázi, štěpí FXI na FXIa a aktivuje faktor V na Va na povrchu destičky. Trombin dále štěpí von Willebrandův faktor od FVIII (tyto faktory cirkulují spolu). Tím, že dojde k uvolnění von Willebrandova faktoru, nastane adheze a následná agregace trombocytů. Uvolněný faktor VIII je následně aktivován trombinem na FVIIIa (Smith, 2009).

### 1.3.1.3 Propagace

V této finální fázi je zesílena tvorba trombinu na povrchu krevních destiček. Faktor Va se spojí s FXa a dojde k vytvoření protrombinázového komplexu, zatímco FVIIIa společně s FIXa utvoří komplex zvaný vnitřní tenáza. Tato protrombináza a vnitřní tenáza slouží ke zvýšení aktivity faktorů Xa a IXa, vytvářející dostatečné množství trombinu a následně k produkci velkého množství nerozpustného fibrinu. V této fázi trombin štěpí FXIII na FXIIIa, který zesiluje řetězce fibrinu. Tím, že se agregují krevní destičky a dojde k zesílení fibrinu, vytvoří se stabilní sraženina, která utěsňuje místo poranění a zabraňuje nadměrné ztrátě krve (Yau, Teoh a Verma, 2015). Celé schéma nového modelu hemokoagulace je zobrazeno na obrázku 4).



Obrázek 4: Nový model hemokoagulace (upraveno dle Pérez-Goméz a Bover, 2007)

## 2. ČERVENÉ KRVINKY

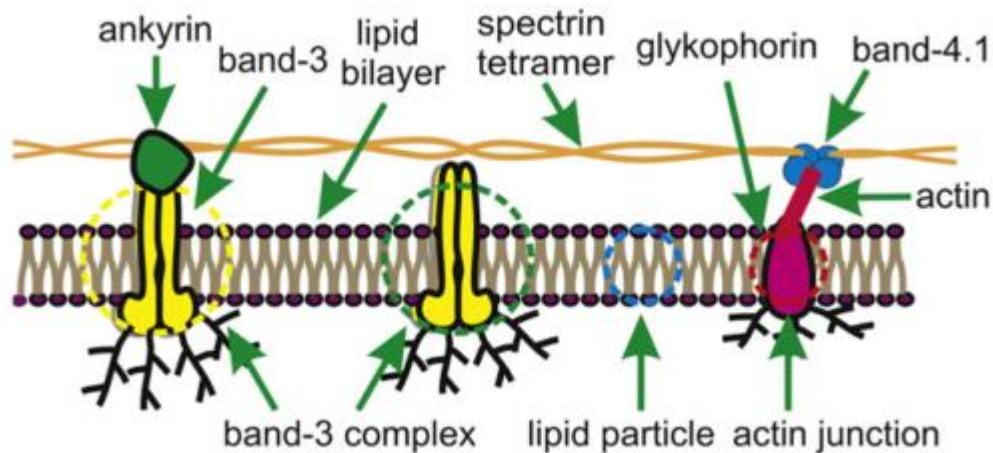
Červená krvinka, jinak také erytrocyt, je krevní buňka. Ačkoli se jedná o jednu z nejjednodušších buněk, její funkce v organismu je velice důležitá, protože transportuje dýchací plyny. Jedná se o bezjadernou buňku, která má typický bikonkávní tvar. Zdravý erytrocyt má v průměru přibližně 7,5-8,1  $\mu\text{m}$  a šířku 1,7-2,2  $\mu\text{m}$ . Díky tomuto tvaru má erytrocyt větší povrch (140  $\mu\text{m}^2$ ), díky čemuž je schopen vázat více kyslíku. Erytrocyt musí také během svého oběhu kapilárami mnohonásobně zmenšit svůj průměr. Této deformace dosáhne díky strukturálním vlastnostem a složením buněčné membrány (*Pasricha, 2014*).

### 2.1 Erytropoéza

Erytropoéza neboli krvetvorba je složitý proces složený z více kroků, který probíhá v kostní dřeni resp. v mikroprostředí zvaném niché. Zahrnuje diferenciaci erytrocytárních progenitorů na bezjaderné červené krvinky. Vše začíná u pluripotentní kmenové buňky, ze které se generují erytrocytární prekurzory (erytoblasty), a z nich se následně vytvoří zralý erytrocyt. Popis vývoje erytrocytu je zobrazen na obrázku 5 (*Tsiftoglou, Vizirianakis a Strouboulis, 2009*). Hlavním regulátorem erytropoézy je hormon erythropoetin. Jedná se o glykoprotein produkovaný v ledvinách, a aby mohla erytropoéza probíhat bez problému je nutná dostatečná zásoba tří dalších živin – kyselina listová, vitamin B<sub>12</sub> a železo. Nedostatek těchto živin může vést ke snížené produkci erytrocytů a následně i snížení počtu cirkulujících červených krvinek (*Koury a Ponka, 2004*).

### 2.2 Membrána červených krvinek

Membrána červených krvinek se skládá z mnoha částí, které jsou zodpovědné za řadu fyziologických funkcí a mechanických vlastností buňky. Tato membrána je složena z lipidové dvojvrstvy, integrálních proteinů a membránového skeletu (*Tse, Lux 1999*), kdy strukturální uspořádání buněčné membrány umožňuje erytrocytu se deformovat během své cirkulace v krvi, aniž by došlo k poškození jeho strukturální integrity (*Mohandas, Gallagher 2008*).

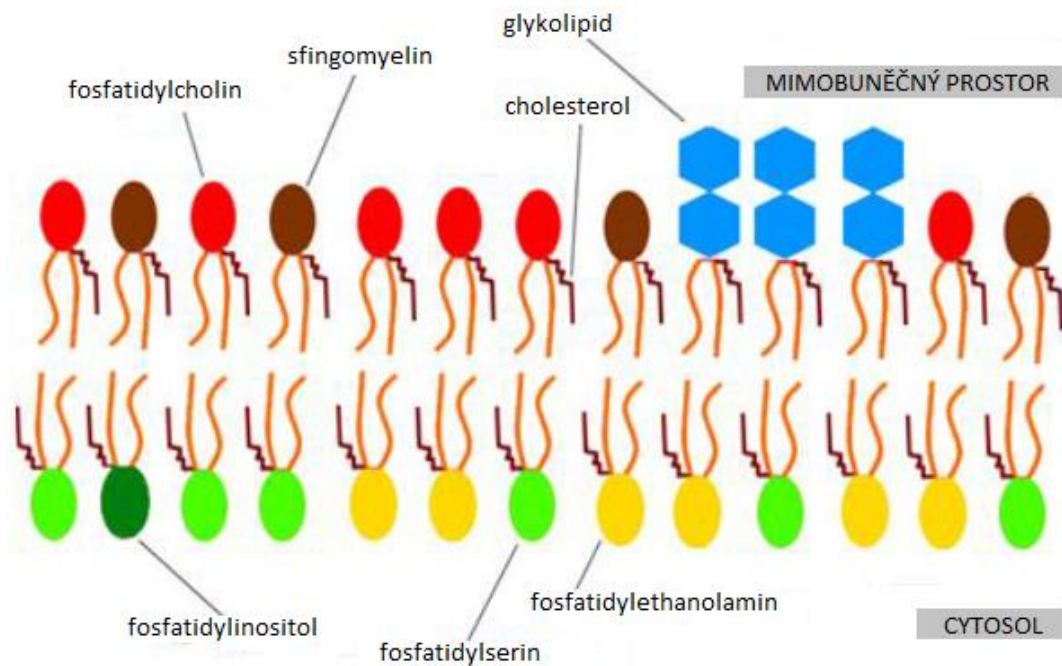


Obrázek 5: Struktura membrány erytrocytu: Zleva: Komplex proužek 3 je spojen se spektrínovou sítí díky ankyrinu. Band 3 komplex označuje volný komplex proužku 3. Modrý kroužek odpovídá lipidovým částicím a červený kroužek označuje aktinová spojení (Li, Lykotrafitis 2012).

Membrána krvinek je složena z dvourozměrné (2D) spektrínové sítě, která je spojena do lipidové dvojvrstvy. Tato dvojvrstva se skládá z různých typů fosfolipidů, sfingolipidů, cholesterolu a integrálních membránových proteinů, které jsou připojeny k lipidové dvojvrstvě přes periferní membránové proteiny (Li, Lykotrafitis 2012). Membránové proteiny budou více popsány v kapitole 2.2.2.

### 2.2.1 Membránové lipidy

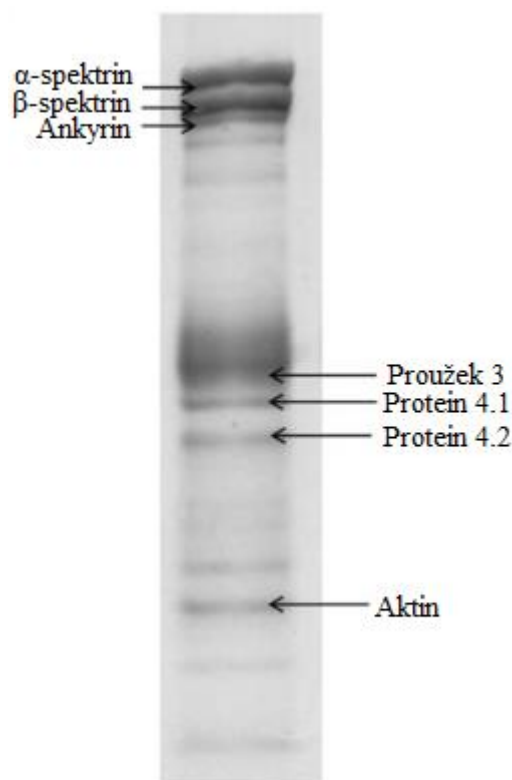
Hmotnostní zastoupení fosfolipidů a cholesterolu je stejné (Mohandas, Gallagher 2008), přičemž dohromady tvoří přibližně 50% hmotnosti zralých červených krvinek. V buněčné membráně se vyskytuje také malé množství glykolipidů. Hlavními zástupci fosfolipidů v membráně červených krvinek jsou: fosfatidylcholin, sfingomyelin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin a v malém množství fosfatidylinositol (Yawata, 2003). První dva fosfolipidy se nacházejí na vnější straně lipidové dvojvrstvy a fosfatidylethanolamin a fosfatidylserin jsou lokalizovány na straně vnitřní (Mohandas, Gallagher 2008). Toto asymetrické uspořádání se nazývá *trans* asymetrie a je zobrazeno na obrázku 6 (Yawata, 2003).



Obrázek 6: Asymetrické rozložení fosfolipidů v buněčné membráně (upraveno dle Alberts, 2002)

### 2.2.2 Membránové proteiny

Membránové proteiny, jejichž rozdělení pomocí elektroforézy je na obrázku 7, se rozdělují do dvou skupin podle toho, jak snadno se mohou odstranit z membrány. Některé z nich mohou být snadno odstraněny extrakcí, pravděpodobně proto, že jsou spojeny pouze s jednou stranou membrány. Skupina proteinů, kterou lze snadno odstranit, se nazývá „periferní proteiny“ a druhá skupina se nazývá „integrální proteiny“. Kromě tohoto dělení jsou membránové proteiny klasifikovány do třech kategorií podle jejich funkčních vlastností v membráně. První jsou cytoskeletální proteiny, jejichž typickými zástupci jsou spektrin, protein 4.1 a aktin. Druhá je skupina integrálních proteinů, kam patří proužek 3 a glykoforiny. Ankyrin a protein 4.2 tvoří třetí skupinu tzv. kotvících proteinů, které se spojují s cytoskeletární sítí a integrálními proteiny (Yawata 2008).



Obrázek 7: Elektroforéza membránových proteinů erytrocytu (převzato z Debaugnies, 2011)

### 2.2.3 Periferní membránové proteiny

Periferní membránové proteiny jsou nepřímo spojené s buněčnou membránou přes interakci protein-protein. Byly definovány jako proteiny, které se odstraní z membrány pomocí polárních činidel. Těmi jsou roztoky o vysokém pH nebo s vysokou koncentrací soli, aniž by došlo k porušení fosfolipidové dvojvrstvy (Cooper, 2000).

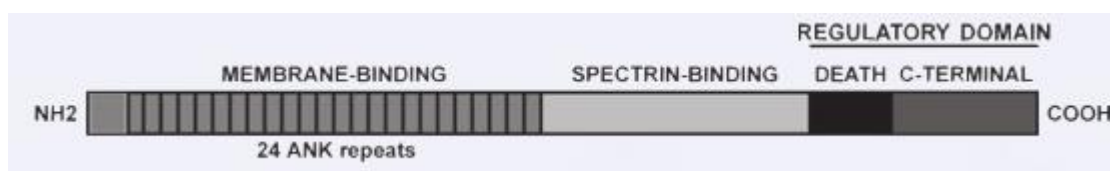
#### 2.2.3.1 Spektrin

Jedná se o cytoskeletární protein, který byl objeven v erytrocytech a je důležitý pro zachování stability, struktury a tvaru buněčné membrány. Tento protein byl poprvé izolován z erytrocytu postrádající hemoglobin, jinak také zvaný „duch“. Jedná se o velkou molekulu, která se skládá ze 106 aminokyselinových zbytků označované jako repetic (Zhang *et al.* 2013). Vlastnosti těchto repetit, jako je jejich uspořádání, orientace a stabilita, jsou považovány za klíčové ve struktuře a mechanických vlastnostech spektrinu (Czogalla *et al.*, 2007). Spektrin tvoří dvě antiparalelní formy  $\alpha$  a  $\beta$  spektrin, které spolu vytvářejí tetramery (Burton a Bruce, 2011).

Aby mohlo dojít k vytvoření membránového skeletu, vyžaduje spektrin interakci s dalšími proteiny. Hlavním proteinem, který zajišťuje tuto interakci, je ankyrin. Jiné spoje spektrinu s membránou jsou zprostředkovány proteinem 4.1, který se nachází na konci spektrinové molekuly (Bennet a Lambert, 1991).

### 2.2.3.2 Ankyrin

V lidském těle se nacházejí tři hlavní ankyrinové izoformy (R, v erythrocytech; B, v mozku; G, který je v těle produkován na více místech). Přehled exprese ankyrinu v lidském těle je uveden v tabulce 2 (Ipsaro a Mondragon, 2010). Erythrocytární izoforma ankyrinu je velký protein nacházející se v červených krvinkách v množství  $1,25 \times 10^5$  (Satchwell, Shoemark, Sessions a Toye, 2009). Erythrocytární ankyrin lze rozdělit do tří domén: membránovou, spektrinovou a regulační (obrázek 10).



Obrázek 8: Funkční domény ankyrinu: Zleva: Membránová doména složená z 24 ANK repetitivních zprostředkovávající interakci s různými iontovými výměníky; spektrinová doména interaguje s cytoskeletem přes  $\beta$ -spektrin; regulační doména složená z poddomén (převzato z Cunha a Mohler 2009)

Membránová doména je složená z krátkých ankyrinových repetitivních tvořící strukturu podobnou spirále a předpokládá se, že se jedná o vazebné místo pro proužek 3. Další spektrinová doména je lokalizována mezi ANK-zbytky 828 a 1386. Tato doména reaguje s  $\beta$ -spektrinovou repetitivní 14 a 15. Poslední doména (regulační) nemá jasného vazebného partnera, ale její přítomnost může ovlivňovat vazbu ankyrinu k proužku 3 a spektrinu (Kümpornsin, Jiemsup, Yongkiettrakul a Chookajorn, 2011). Poruchy ankyrinu jsou nejčastější příčinou vzniku hereditární sferocytózy (Satchwell, Shoemark, Sessions a Toye, 2009).



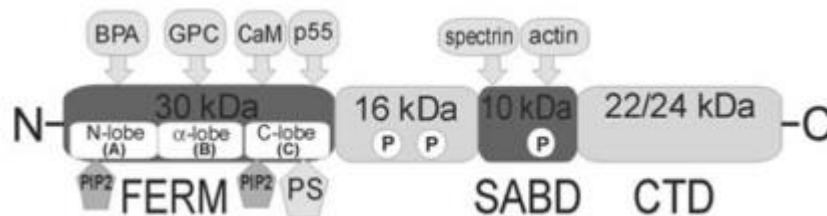
Tabulka 2: Exprese ankyrinu v tkáních

Tkáň	Ankyrin-G	Ankyrin-B	Ankyrin-R
Mozek	270, 480 kDa	220, 440 kDa	186, 215 kDa
Srdce	190 kDa	160, 220 kDa	210 kDa
Kosterní svalovina	107-130, 119 kDa	220 kDa	20-30 kDa
Plíce	190, 200-215 kDa	220 kDa	
Ledviny	119,190,200-215 kDa	220 kDa	
Erytrocyty			186-215 kDa

### 2.2.3.3 Protein 4.1

Protein 4.1 je globulární fosfoprotein přítomný v červených krvinkách v počtu přibližně  $200 \times 10^3$  kopií a je schopný vázat různé proteiny a tím je nezbytný pro organizaci membránového skeletu červených krvinek. V červených krvinkách se nachází dvě formy proteinu 4.1, které se liší svou molekulární hmotností. Jedná se o protein 4.1a (80 kDa) a protein 4.1b (78 kDa), přičemž rozdíl jejich molekulových hmotností je dán konverzí asparaginu. Protein 4.1a se ojediněle objevuje v mladých erythrocytech a jejich počet se zvyšuje s „věkem“ erythrocytů. Proto je tato forma užitečným indikátorem stárnutí buněk (Yawata, 2003).

Stejně jako ankyrin, je protein 4.1 složen z funkčních domén (obrázek 9). Nejdůležitější je doména známá jako FERM (*Four.one protein, Ezrin, Radixin, Moesin*). Tato doména je zodpovědná za vazbu proteinu 4.1 k ostatním proteinům, jako je glykoforin C, protein p55 a kalmodulin. Druhá doména proteinu 4.1 je doména 16kDa, která odděluje FERM doménu od ostatních, nicméně její funkce není zatím známa. Po té následuje SABD (*Spectrin-Actin Binding Domain*) doména, která váže spektrin a aktin. Poslední je 22/24 kDa CTD (*C-Terminal Domain*) doména (Diakowski, Grzybek a Sikorski, 2006).



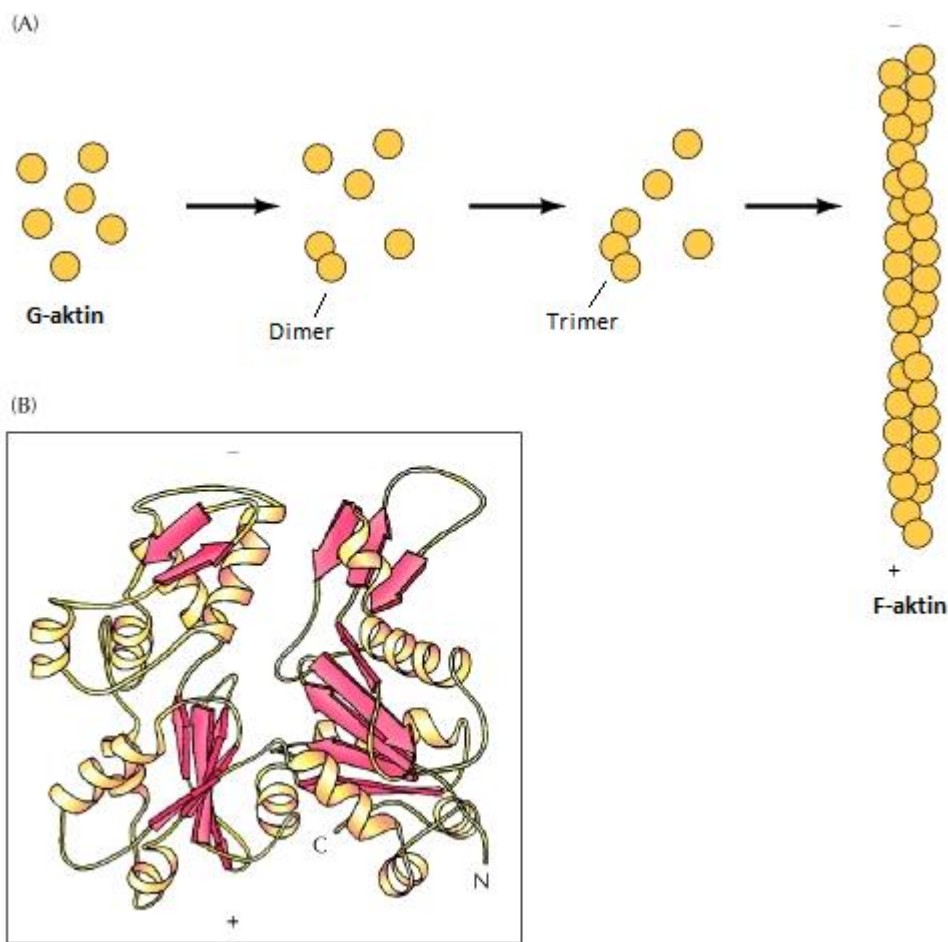
Obrázek 9: Funkční domény proteinu 4.1: FERM-4.1-ezrin-radixin-moesin doména, SABD-spectrin-actin-binding domain, CTD-carboxyl-terminal domain, BPA-band 3 (proužek 3), CaM-calmomodulin, PIP-phosphatidylositol 4,5-bisphosphate, PS-phosphatidylserine (převzato z Diakowski, Grzybek a Sikorski, 2006)

#### 2.2.3.4 Protein 4.2

Tento periferní membránový protein je hojně vyskytující se složka membrány erytrocytů, na jeden erytrocyt připadá  $2,5 \times 10^5$  kopií, a jeho molekulová hmotnost je 72 kDa. Přesný význam tohoto proteinu nebyl zatím objasněn, ale váže se na doménu proužku 3 a dále také interaguje s ankyrinem v červených krvinkách. V roztoku se spojuje se spektrinem a proteinem 4.1, nicméně tato skutečnost musí být ještě prokázána *in vivo*. Nejdůležitější role proteinu 4.1 je v udržení strukturní integrity membrány erytrocytů a jeho absence způsobená genovou mutací má za následek hereditární sferocytózu (*Satchwell, Shoemark, Sessions a Toye, 2009*).

#### 2.2.3.5 Aktin

Erytrocytární aktin (375 AMK, 43 kDa) je přítomen v počtu  $400-500 \times 10^3$  kopií na jednu buňku a tvoří 5,5 % z celkového počtu membránových proteinů (*Yawata, 2003*). Tento protein tvoří filamenta (*Flaherty, McKay, Kabsch a. Holmes, 1991*) tak, že každý monomer aktinu – globulární G-aktin – je pevně spojen přes interakci „head-to-tail“ s dalšími dvěma aktinovými monomery. Tím dojde k polymerizaci monomerů a vytvoří se právě tato filamenta – filamentární F-aktin. Tvorba filament je zobrazena na obrázku 10.



Obrázek 10: Tvorba a struktura aktinových filament: (A) Znázornění tvorby aktinových filament (F aktin) z aktinových monomerů (G aktin). První krok je formace dimerů a trimerů, které se zvětšují přidáním monomerů. (B) Prostorový model F aktinu. (převzato z Cooper, 2000)

Protože je polymerizace vratný proces, filamenta se mohou depolymerizovat, aby byla zachována rovnováha mezi aktinovými monomery a filamenty. To je regulováno aktin-vázajícími proteiny. Klíčovým proteinem zodpovědným za rozklad filament je kofilin, který se váže na filamenta a zvyšuje disociaci aktinových monomerů. Proti tomuto proteinu pracuje další aktin-vázající protein, profilin, který stimuluje inkorporaci aktinových monomerů do filament (Cooper 2000).

## 2.2.4 Integrální membránové proteiny

Jsou to proteiny, které jsou zakomponovány v lipidových dvojvrstvách buněčných membrán. K uvolnění těchto integrálních proteinů z membrány se používají látky, které narušují hydrofobní interakce. Nejčastěji se používají detergenty, které jsou amfipatické (obsahují hydrofobní i hydrofilní skupiny) a díky nim se stanou proteiny rozpustnými ve vodě (Cooper, 2000).

### 2.2.4.1 Proužek 3

Tento integrální protein je hlavním proteinem červených krvinek. Je znám také jako *anion exchanger 1* a jedná se o glykoprotein s molekulovou hmotností okolo 100 kDa . Tvoří 25-30% z celkového počtu membránových proteinů. Proužek 3 se skládá z cytoplasmatické (N-terminální) a transmembránové (C-terminalní) domény (Yawata, 2003). Cytoplasmatická doména (1-359 AMK) se účastní interakce s enzymy, hemoglobinem a strukturními proteiny, zatímco transmembránová doména je důležitá pro transportní funkci proteinu (Barneaud-Roca, Etchebest a Guizouarn, 2013).

### 2.2.4.2 Glykoforiny a aquaporiny

Dalšími integrálními proteiny jsou glykoforiny s vysokým obsahem kyseliny sialové. Existuje pět typů glykoforinů, A, B, C, D a E (Yawata, 2003), které dohromady tvoří asi 2% z celkového počtu membránových proteinů červených krvinek. Glykoforin (GP) A, jako hlavní složka, je přítomen v  $5-9 \times 10^5$  kopiích na jednu buňku, zatímco GPB, GPC a GPD se vyskytují v menším množství (Chasis a Mohandas, 1992). Obsah kyseliny sialové je hlavním důvodem záporného náboje membrány červených krvinek. Proto je nejdůležitější funkcí GP minimalizovat interakce mezi buňkami a zabránit agregaci červených krvinek v krevním oběhu (Poole, 2000).

Aquaporiny (AQPs) jsou skupina integrálních proteinů, které usnadňují prostup vody skrz buněčnou membránu (Agarwal a Gupta, 2008). Funkčně jsou aquaporiny rozděleny do tří podskupin: ortodoxní AQPs (AQP1, 2, 4 a 5), které jsou propustné pouze pro vodu; aquaglycerolporiny (AQP3, 7, 9 a 10), tyto jsou propustné pro glycerol stejně jako pro vodu; a neortodoxní AQPs (AQP6, 8, 11 a 12), se specifickou funkcí (Pelagalli, Squillacioti, Mirabella a Meli, 2016). Buňky mající aquaporiny na své plasmatické membráně vykazují mnohonásobně vyšší prostupnost membrány pro vodu než buňky, které aquaporiny neobsahují (Verkman, 2012).

### 3. PŮSOBENÍ ERYTROCYTŮ V HEMOSTÁZE

Hlavní rolí červených krvinek je transportovat kyslík do tkání převážně malými kapilárami. Nicméně červené krvinky dokážou jedinečným způsobem ovlivňovat tok krve ve všech typech a velikostech krevních cév. Jejich schopnost transportovat kyslík je velmi dobře známa, na rozdíl od jejich role při hemostáze či trombóze (*Barshtein, Ben-Ami a Yedgar, 2007*). Před více než 100 lety bylo zaznamenáno u pacientů s anémií prodloužení času krvácení nezávisle na počtu krevních destiček. Bylo také zjištěno, že mnoho poruch krvácivosti lze léčit zvýšením počtu červených krvinek i přes nízký či normální obsah trombocytů. Na druhé straně je abnormálně vysoký hematokrit spojen s trombózou a pacienti užívající erytropoetin jsou náchylnější k trombóze a tromboembolii. Tyto a další výzkumy představují nepřímé, ale silné důkazy o důležité roli červených krvinek v hemostáze a trombóze (*Litvinov a Weisel, 2016*).

#### 3.1 Reologická funkce

Reologie je obecně věda, která se zabývá prouděním a deformačním chováním různých druhů materiálů, přičemž materiály mohou být pevné látky, kapaliny a plyny. Hemoreologie, jak už název napovídá, je vědní obor zaměřen na proudění a deformační vlastnosti krve (*Baskurt a Meiselman, 2003*). S tím souvisí viskozita krve, která je dána hematokritem, viskozitou plazmy dále agregací a deformací buněk (*Chien, 1987*). Vysoký hematokrit vede ke zvýšení viskozity krve, což má za následek zhoršení jejího toku. To může být silným protrombotickým faktorem, protože narušený tok krve je součástí tzv. Virchowovy triády, která vysvětluje patofyziologické mechanismy trombózy způsobené kombinací hyperkoagulability, poruchy toku krve a poškození endotelu. Viskozita krve spojená s hematokritem má fyzikální působení na interakci mezi destičkami a povrchem krevních cév. Při průtoku krve se adheze krevních destiček zvyšuje se zvyšujícím se hematokritem. To znamená, že obsah frakce červených krvinek má důležitou roli na hemostázu a trombózu. Viskozita klesá s tím, jak se zmenšuje průměr cév (Fahraeus-Lindqvist efekt), až do 5-7  $\mu\text{m}$ . Ve fázi kdy je průměr cév menší než průměr červených krvinek se viskozita zvyšuje kvůli přítomnosti destiček, které mají lepší viskozitu než červené krvinky (*Litvinov a Weisel, 2016*).

Červené krvinky jsou u savců nejvíce flexibilní buňky. Dokáží měnit svůj tvar do elipsoidních struktur pomocí vnějších sil mnohem snadněji v porovnání s ostatními buňkami. Takové změny usnadňují jejich tok v cévách, což vede ke snížení viskozity krve. K této změně tvaru dochází při vysoké smykové rychlosti a hlavními determinantami, díky kterým dochází ke změně tvaru, jsou bikonkávní tvar erytrocytů, dále absence buněčného jádra a organel a také specifické uspořádání membrány (Baskurt, Meiselman a Simmonds, 2013). Červené krvinky se chovají jako pružná tělesa a změna tvaru je reverzibilní takže po odstranění deformujících sil získají svůj původní tvar (Baskurt a Meiselman, 2003). Tužší erytrocyty jsou méně schopné projít kapilárami a zvyšují marginaci destiček, tím se zvyšuje náchylnost k trombóze. Zvýšená tuhost červených krvinek může být způsobena sníženou deformovatelností membrány.

Hlavním, klinicky významným rysem určitých dědičných poruch je právě snížená schopnost červených krvinek se deformovat. U pacientů se srpkovitou anémií jsou membrány červených krvinek tužší než u normálních buněk. Buňky se stávají tužšími, pokud dojde k polymerizaci mutovaného hemoglobinu, což má za následek typický srpkovitý tvar. U jiných nemocí, včetně  $\beta$ -talasémie, hemolytické anémie, způsobenou imunochemickou reakcí, a hereditární stomatocytózy, je membrána červených krvinek také tužší než za fyziologických podmínek. Některé choroby jako diabetes, hypertenze, trombóza v dolních končetinách a ischemická choroba srdeční, mohou měnit vlastnosti červených krvinek a tím je dělat tužší a protrombotické. Snížená deformovatelnost červených krvinek snižuje propustnost krevních sraženin a trombu, což může mít vliv na pronikání a účinek fibrinolytických látek.

Další hemoreologická funkce červených krvinek při hemostáze je jejich agregace. Ta nastává, když se bikonkávní krvinky „slepí“ do takzvaných *rouleaux* při nízké smykové rychlosti nebo dokonce při stáze krve, na rozdíl od deformace červených krvinek (Litvinov a Weisel, 2016). Agregaci červených krvinek lze hodnotit několika způsoby, přičemž nejpoužívanější z nich je test sedimentace erytrocytů ESR (*Erythrocyte Sedimentation Rate*). Při tomto testu se sleduje sedimentace červených krvinek ve zkumavce ve vertikální poloze. ESR je relativně pomalá metoda a díky ní získáme jen údaj o sedimentaci agregátu za 1 hodinu. Pro podrobnější pozorování agregátů byly vyvinuty automatizované metody založené na fotometrických technikách. Tyto přístroje měří odraz světla nebo průchod světla skrz suspenzi erytrocytů. A protože proces agregace snižuje počet a zároveň zvyšuje velikost částic, lze zjistit její rozsah a rychlost. Mikroskopické techniky mohou být také využity ke kvantifikaci agregace pozorováním počtu agregátů v definovaném množství zředěné suspenze erytrocytů (Baskurt a Meiselman, 2003). Vzniklé agregáty se velice obtížně rozpouštějí a mají tendenci zvyšovat viskozitu krve, což má za následek vznik trombózy v žilách (Litvinov a Weisel, 2016).

## 3.2 Mezibuněčné interakce

Přímá interakce mezi buňkami je rozhodujícím faktorem pro vývoj a funkci mnohobuněčných organismů. Některé interakce mezi buňkami jsou přechodné, jako je například interakce mezi buňkami imunitního systému a interakce, díky kterým jsou bílé krvinky směřovány k zánětlivé tkáni. V jiných případech hraje stabilní mezibuněčné spojení klíčovou roli v uspořádání buněk ve tkáních (*Cooper, 2000*).

Červené krvinky ovlivňují trombózu a zánět skrz jejich adhezi k endotelu (*Villa, Muzykantov a Cines, 2016*). Adheze buněk je základním prvkem struktury mnoha tkání a je zprostředkována několika povrchovými proteiny (CAM). Existuje pět hlavních tříd CAM: kadheriny, imunoglobuliny, selektiny, muciny a integriny. Mezibuněčná adheze způsobená kadheriny a selektiny je závislá na koncentraci vápenatých iontů, zatímco adheze zprostředkovaná integriny a imunoglobuliny nikoli (*Lodish, Berk a Zipursky et al., 2000*). Přilnavost k povrchu endotelu je jednou z prvních zaznamenaných událostí, která předcházela adhezi krevních destiček. Do adheze červených krvinek k cévám je zapojeno mnoho interakcí mezi receptory jako je například interakce erytrocytárního  $\alpha_4\beta_1$  integrinu (známý také jako VLA-4) s endotelovým VCAM-1, erytrocytární *Lutheran blood group* antigen (nebo BCAM – *Basal Cell Adhesion Molecule*) s extracelulárním proteinem lamininem a interakce erytrocytárního ICAM4 (známý také jako Landersteiner-Wiener krevní skupinový antigen) a endotelovým  $\alpha_v\beta_3$  integrinem. Adhezní receptory budou více popsány v následující kapitole.

Některé adhezivní ligandy mohou být přednostně vylučovány na červených krvinkách při patologických onemocnění. Tím je například exprese erytrocytárního membránového proteinu *Plasmodium Falciparum* a RIFINS (*Repetitive Intersperse Families of polypeptides*) u malárie. Dále také u krevních skupin 0 a A, kdy je přilnavost infikovaných červených krvinek k cévní stěně hlavní příčinou mozkových cévních příhod a smrti. Imunologické mechanismy podporující adhezi červených krvinek jsou například vazba protilátek, ukládání imunokomplexů a fixace komplementu. Zvýšená adheze červených krvinek u pacientů s diabetes mellitus je způsobena glykací membránových proteinů erytrocytu, což vede k jejich interakci s RAGE (*Receptors Advanced Glycation End*) produkty. Interakce mezi erytrocyty a krevními destičkami díky biomechanickým silám, párování receptoru s ligandem zvyšuje reaktivitu destiček a tím i predispozici k trombóze (Villa, Muzykantov a Cines, 2016).

### 3.2.1 Adhezní receptory

Lidské erytrocyty produkují relativně velké množství adhezních receptorů (obrázek 11), a to navzdory skutečnosti, že červené krvinky jsou obecně považovány za neadhezivní (Setty, 2002). V následujících podkapitolách budou detailněji popsány adhezní receptory účastníci se adheze erytrocytů.

#### 3.2.1.1 VLA-4

Prvním receptorem zapojující se do adheze je VLA-4 (*Very Late Activation antigen*) integrin. Integrin VLA-4 je heterodimer složený ze  $\alpha_4$  a  $\beta_1$  řetězce. Je exprimován lymfocyty a v jiných tkáních se zúčastní interakce mezi buňkami a extracelulární matrix. VLA-4 podporuje adhezi díky interakci s VCAM-1, který se nachází zejména na aktivovaných endotelových buňkách a mimo jiné se také VLA-4 váže na polypeptid von Willebrandova faktoru. Stejně jako mnoho dalších adhezních molekul může VLA-4 podléhat aktivaci, která je zprostředkována fosfolipázou C. Cytoplasmatická doména VLA-4 může být spojena s cytoskeletálními proteiny. Adheze nebo navázání ligandu pomocí VLA-4 má různé účinky na rozdílné tkáně jako například role VLA-4 v aktivaci paměťových B-lymfocytů a zabránění apoptóze CD 34 kmenových buněk (Telen, 2000).



### 3.2.1.2 VCAM-1 – Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Dalším popisovaným receptorem je VCAM-1. Ten je vytvářen v kostní dřeni mezenchymálními stromálními buňkami a v určitých hematopoetických buňkách (B lymfocyty, dendritické buňky a makrofágy). Patří do skupiny imunoglobulinových proteinů. VCAM-1 se skládá z několika extracelulárních domén, které jsou spojené disulfidickými můstky, transmembránové domény a cytoplasmatické domény s 19 aminokyselinami. Je zajímavé, že pořadí těchto aminokyselin je identické mezi různými druhy včetně krysy, myši nebo lidí. Jeho hlavním ligandem je již zmiňovaný VLA-4 s vazebnými místy umístěnými v první a čtvrté imunoglobulinové doméně. Jiné ligandy se vážou s nižší afinitou (*Ulyanova et al., 2005*). V kombinaci s ostatními adhezními molekulami reguluje imunitní systém a zánět a jeho exprese je vyvolána cytokiny produkovanými v tkáních (*Cook-Mills, Marchese a Abdala-Valencia, 2011*).

### 3.2.1.3 Lu/B-CAM – Lutheran Basal Cell Adhesion Molecule

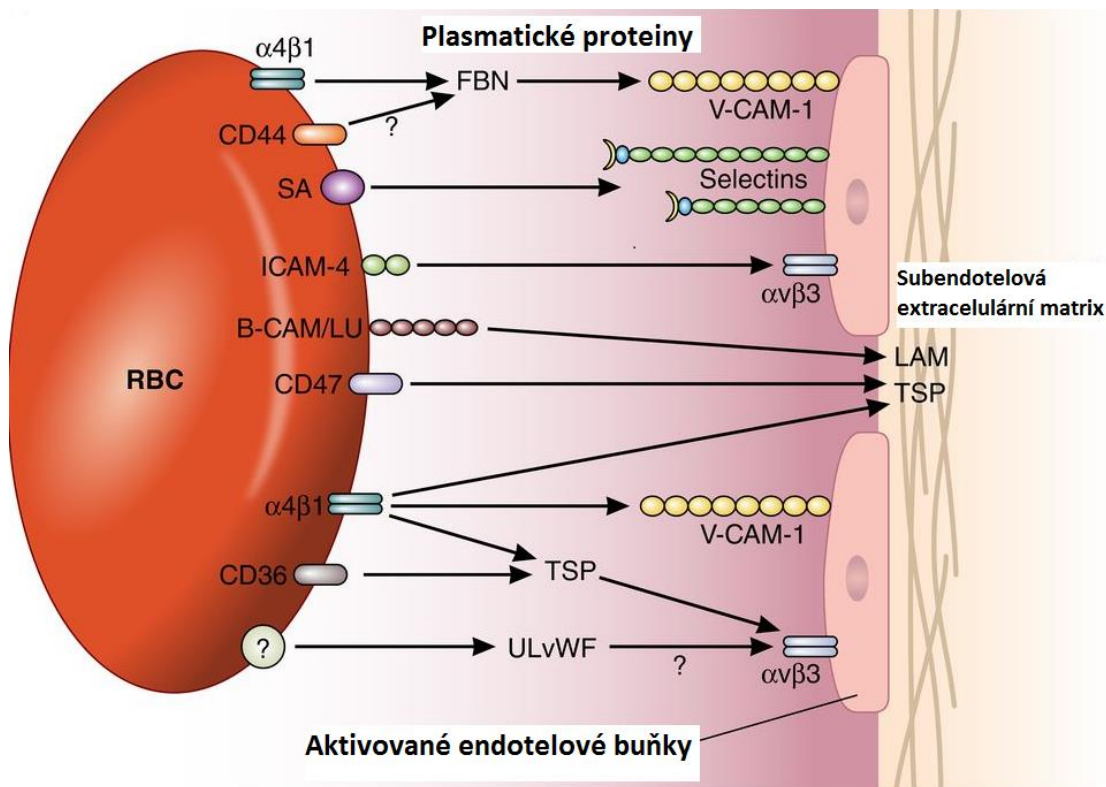
Lu/B-CAM (z angličtiny *Lutheran Basal Cell Adhesion Molecule*) je glykoprotein na povrchu buněk o molekulové hmotnosti 90 kDa (*Collec et al., 2011*). Jedná se o transmembránové proteiny, které tvoří dvě isoformy složených z 628 (Lu) a 588 [Lu(v13)] aminokyselin. Tyto isoformy se liší délkou svých cytoplasmatických domén. Jsou exprimovány v mnoha tkáních, včetně epitelových a endotelových buněk. Lu/B-CAM glykoproteiny jsou jedinečným receptorem na erytrocytu pro laminin, hlavní složku extracelulární matrix. Vazba na laminin je zprostředkována přes kyselinu asparagovou a podílí se na abnormální adhezi erytrocytů k cévní stěně u pacientů se srpkovitou anémií. Lu/B-CAM jsou spojeny s membránou erytrocytů interakcí cytoplasmatické domény s komplexem spektrin-aktin-protein 4.1. Adheze k lamininu zprostředkovaná Lu/B-CAM může být aktivována buď fosforylací isoformy cytoplasmatické domény nebo oddělením Lu/B-CAM od spektrinového membránového skeletu (*El Nemer, Colin a Le Van Kim, 2010*).

#### 3.2.1.4 Laminin

Dalším proteinem, který se zúčastní adheze erytrocytů je laminin. Tento glykoprotein je hlavní složkou bazální membrány (laminy) a vytváří strukturu membrán téměř v každé zvířecí tkáni. Je vylučován a začleněn do buněčných extracelulárních matrix. Každý laminin je heterotrimer složený  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek (Colognato a Yurchenco, 2000). Bylo identifikováno 15 isoformů a exprese těchto isoformů je regulována během embryonálního vývoje. Tím se rozvíjejí jejich odlišné funkce v různých typech buněk zprostředkované interakcemi s různými typy receptorů (Miyazaki *et al.*, 2008). Lamininy jsou schopné se vázat samy na sebe a také na jiné makromolekuly. Mají unikátní a sdílené mezibuněčné interakce, které jsou zprostředkované integriny, dystroglykanem a dalšími receptory. Díky těmto interakcím přispívají lamininy k diferenciaci buněk, k jejich tvaru a pohybu a také podporují přežití tkání (Colognato a Yurchenco, 2000).

#### 3.2.1.5 ICAM-4 –IntraCellular Adhesion Molecule 4

ICAM-4 je známý jako Landersteiner-Wiener (LW) antigen a je schopen se vázat na řadu integrinů. Ligandy pro LW jsou  $\beta_1$  integriny leukocytů, stejně jako  $\alpha_v$  integriny a integrin krevních destiček  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a mimo jiné i integrin  $\alpha_v\beta_3$ , což je integrin účastnící se interakce s erytrocyty (Hermand *et al.*, 2004). Tento integrin se také nazývá vitronektin receptor a je složen ze 125-kDa  $\alpha_v$  a 105-kDa  $\beta_3$  podjednotek. Váže na širokou škálu extracelulárních molekul obsahující trojici aminokyselin (arginin, glycin a kyselina asparagová), mezi takové molekuly patří fibronektin, fibrinogen, von Willebrandův faktor, vitronektin a proteolyzované formy kolagenu a lamininu. Tím se odlišuje od jiných integrinů jako je například  $\alpha_v\beta_1$ , který se selektivně váže pouze na fibronektin. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  má několik odlišných rolí v rozdílných procesech, jako je například role u nádorových metastáz nebo v angiogenezi, ve které se tento integrin jeví jako nejdůležitější ze všech integrinů (Liu, Wang a Chen, 2008).



Obrázek 11: Adhezivní interakce RBC s endotelem; RBC-Red Blood Cell, SA-Sialic Acid, ICAM-4-IntraCellular Adhesion Molecule 4, B-CAM/LU - Lutheran Basal Cell Adhesion Molecule, FBN-Fibronectin, V-CAM-1- Vascular Cell Adhesion Molecule 1, LAM-Laminins, TSP-Thrombospondin, ULvWF-Ultra-Large von Willebrand Factor (Upraveno dle Telen, 2016)

### 3.2.2 Interakce červených krvinek s trombocyty

Když dojde k interakci destiček se subendotelovým matrix poraněné cévy nastane jejich aktivace a začnou se uvolňovat složky jejich granulí a vytvářet metabolické produkty. Tyto produkty zahrnují adeninové nukleotidy, eikosanoidy a serotonin. Destičky, svou schopností uvolňovat komponenty, působí jako agonisté a podporují interakce mezi dalšími destičkami a tím kladně působí na tvorbu vyvíjeného trombu. Jedním z nejčastějších účinků u reakce destiček je aktivace  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrinu, přičemž tato aktivace je předpokladem vazby fibrinogenu k destičkám, což vede k jejich konečné agregaci (Vallés, 2002). Po aktivaci destiček se uvolní koagulační faktory a faktory aktivující destičky. Mezi ně patří P-selektin, který se běžně nachází v trombocytární membráně  $\alpha$  granul. Tomuto procesu se říká degranulace a dochází při něm k rozdělení těchto faktorů z membrány granul do plasmatické membrány (Yeh, Wu et al., 2010). Expres P-selektinu je měřítkem uvolňování granulí trombocytů na aktivovaných krevních destičkách. Interakce P-selektinu a destiček stabilizuje počáteční interakci  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrinu

a fibrinogenu, čímž se podporuje tvorba velkých, stabilních agregátů. Navíc je P-selektin ligand pro glykoprotein P-selektinu na leukocytech, takže podporuje adhezi leukocytů k P-selektinu a přemístění leukocytů k aktivovanému endotelu nebo krevním destičkám. Tím tedy P-selektin a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin mohou přispívat k získání krevních destiček a leukocytů pro tvorbu trombu. Tým Juana Vallése provedl studii, kdy zjistili, že interakce mezi aktivovanými destičkami a erytrocyty je zahájena při aktivaci destiček. Bez destiček jako agonistů, nemohou erytrocyty podporovat jejich aktivaci nebo posílit aktivitu uvolňovaných komponentů, proto se předpokládá, že uvolňované komponenty krevních destiček působí jako mediátory, které způsobí biochemické modifikace generující protrombotickou aktivitu na erytrocytech (Vallés, 2002).

Erytrocyty mohou mít vliv na reaktivitu krevních destiček buď tedy přímo chemicky, nebo díky adhezivním interakcím mezi červenými krvinkami a trombocyty. Červené krvinky podporují agregaci krevních destiček a degranulaci uvolňováním ATP a ADP při nízkém parciálním tlaku kyslíku a nízkém pH. Dalším mechanismem pro aktivaci destiček pomocí krevního lyzátu je extracelulární hemoglobin, který zvyšuje aktivaci destiček snížením biologické dostupnosti oxidu dusnatého (NO). Nebuněčný hemoglobin působí jako silný NO scavenger, zabráňující potlačení aktivaci destiček. Poškozené erytrocyty také uvolňují enzym arginázu, která štěpí aminokyselinu L-arginin, což je substrát pro produkci NO. Přímá adhezivní interakce může být důležitá za patologických podmínek spojené s vysokým výskytem trombóz, jako je například  $\beta$ -talasémie nebo srpkovitá anémie (Litvinov a Weisel 2016).

### 3.2.3 Interakce červených krvinek s endotelem

Existují stále větší důkazy o tom, jak jsou červené krvinky začleněny do tvorby trombu díky specifickým interakcím s aktivovanými endotelovými buňkami. Zralé normální červené krvinky neinteragují s endotelem, avšak za určitých patologických podmínek se stávají vysoce lepivými. Adheze abnormálních a/nebo aktivovaných erytrocytů může přispět k mikrovaskulárním okluzím spojených s trombózou. Mezi nejběžnější patologické stavy, kdy erytrocyty reagují s endotelem, se řadí srpkovitá anémie, malárie a diabetes (Litvinov a Weisel, 2016). Adheze červených krvinek k buňkám endotelu je obvykle považována za nevýznamnou. Existuje souvislost, že různé změny na buněčném povrchu při těchto onemocněních ovlivňují adhezivní schopnost červených krvinek. Například zvýšená produkce fosfatidylserinu na vnější straně membrány je spojena s abnormální adhezí červených krvinek k endotelu při srpkovité anémii (Yang, Koo, Lin a Neu, 2010). Mezibuněčná interakce mezi červenými krvinkami

a endotelem je výrazně silnější než mezi dvěma erytrocyty. Síla potřebná k oddělení erytrocytu od endotelu je alespoň o řád vyšší než síla potřebná pro rozptýlení agregátů červených krvinek (*Barshstein, Ben-Ami a Yedgar, 2007*) a adhezivní interakce erytrocytů jsou zvýšeny produkcí adhezivních proteinů na buněčné membráně (*Alapan, Little a Gurkan, 2014*).

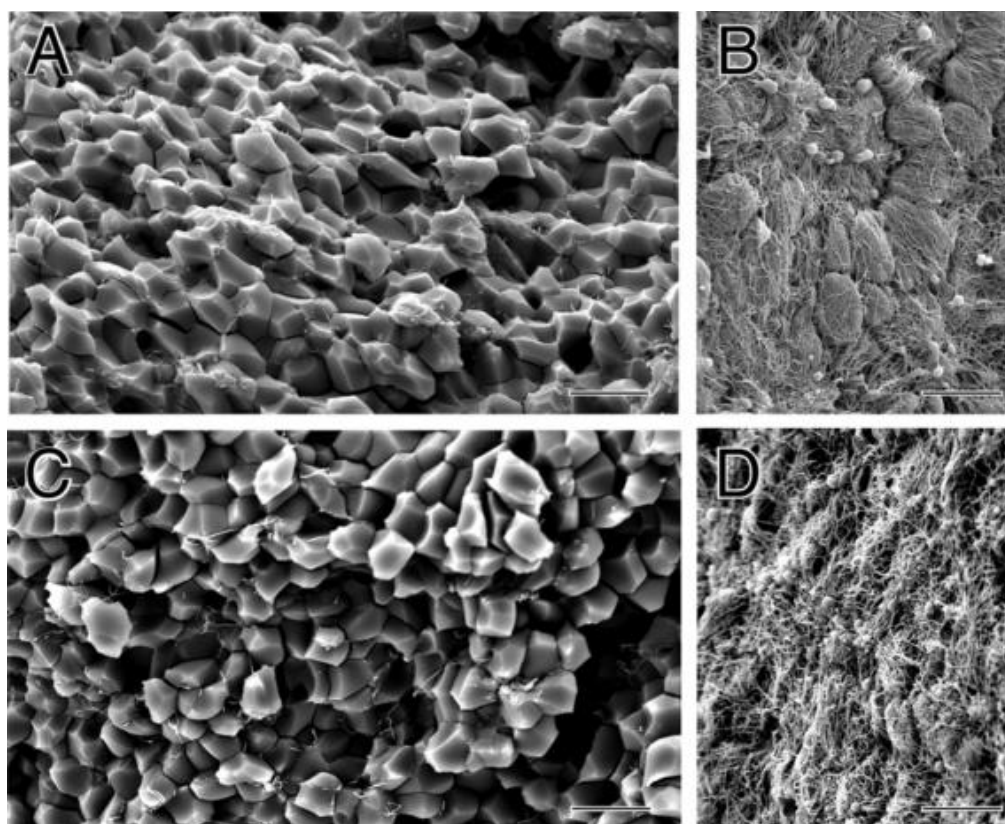
### 3.3 Vliv erytrocytů na tvorbu sraženin

Sraženiny vytvořené z plazmy bohaté na krevní destičky vytvářejí velkou kontraktilní sílu, která začne působit krátce po vzniku sraženiny a její síla se zvyšuje během několika minut až hodin. Funkce krevního srážení není plně známa, ale zdá se, že posiluje hemostázu tím, že vytváří těsnění, podporuje hojení ran přiblížováním jejich okrajů a dále obnovuje průtok krve tak, že snižuje plochu zablokovanou intravaskulárními sraženinami. Přestože jsou erytrocyty hlavní složkou krevních sraženin, o jejich účasti při krevním srážení je známo jen málo. Z historického hlediska byla přítomnost erytrocytů v krevních sraženinách hojně využívána. Například během tzv. pouštění žilou, velikost sraženiny z krve odebrané od pacienta, byla použita k určení hmotnosti erytrocytů a následně k určení, kdy má být tato procedura ukončena.

Přítomnost erytrocytů ovlivňuje strukturu fibrinových sraženin. Při vysokém obsahu červených krvinek jsou fibrinová vlákna uspořádána rovnoměrněji, ale volněji okolo buněk. Ukázalo se také, že se průměr těchto vláken při inkorporaci červených krvinek zvětší a je ovlivněna i viskoelastická sraženiny. Vedle účinků neporušených červených krvinek, volný extracelulární hemoglobin prodlužuje dobu srážení fibrinových vláken v důsledku poškození polymerizace. Tím nepoškozené a i poškozené erytrocyty působí na strukturu fibrinu a celkovou viskoelasticitu sraženiny. Bylo prokázáno, že zadržování erytrocytů ve sraženinách ovlivňuje velikost trombu v závislosti na aktivitě faktoru XIIIa, plasmatické transglutaminázy, která propojuje kovalentně fibrinový polymer a zvyšuje jeho mechanickou stabilitu díky spojení fibrinových řetězců (*Litvinov a Weisel, 2016*).

Cines a jeho tým provedli v roce 2014 studii zkoumající vznik tzv. polyhedrocytů, kdy malé objemy krve (30-40  $\mu$ l) odebrané do citrátu sodného jako antikoagulantu, byly vysráženy rekalifikací a přidavkem trombinu. Poté co bylo srážení dokončeno, byly sraženiny promyty a fixovány a byly zlomeny tak, že vnější a vnitřní strana sraženiny mohla být vyšetřena pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Vnější povrch sraženiny se skládal primárně z husté sítě fibrinu a agregátů krevních destiček. Naproti tomu vnější strana sraženiny se skládala hlavně z těsně uspořádané polyhedry, která měla průměr okolo 5  $\mu$ m, malého množství fibrinu a několika krevními destičkami. Tyto polyhedry jsou stlačené erytrocyty a od toho je odvozen

název polyhedrocyty. Na skenovací elektronové mikroskopii byly pozorovány částečně stlačené erythrocyty, jejichž struktura byla něco mezi typickým bikonkávním tvarem a polyhedrou (obrázek 14). Sraženiny, vytvořené nízkou koncentrací fibrinu (fibrinogenu) nebo s nízkým počtem trombocytů, obsahovaly normálně tvarované erythrocyty jak na vnější tak i vnitřní straně a žádné polyhedrocyty. To naznačuje, že síla kontrakce trombocytů působící na fibrin je nezbytná pro stlačení erythrocytů do polyhedrocytů. Pochopení tohoto mechanismu vzniku sraženiny by mohlo posloužit k terapeutickým účelům například zvýšení hemostázy u traumat nebo by vzájemné ovlivňování s kontrakcí mohlo přispět k prevenci ischemických cévních okluzí (Cines, Lebedeva, Nagaswami, et al., 2014).



Obrázek 12: Struktura krevních sraženin: Skenovací elektronová mikroskopie krevních sraženin aktivovaných trombinem s následnou rekalciifikací. A,C: Vnitřní strana sraženin složených hlavně z těsně uspořádané polyhedry. B,D: Vnější strana sraženin tvořená tenkou sítí fibrinu a trombocytárních agregátů (Cines, Lebedeva, Nagaswami, et al., 2014).

### 3.3.1 Fosfatidylserin a jeho vliv na krevní srážení

Fosfatidylserin byl poprvé popsán u mozkových buněk vědcem Folchem a jeho spolupracovníky v roce 1940. Jedná se o negativně nabitý kyselý fosfolipid v membránách eukaryotických buněk. Tvoří 2 až 20% celkové hmotnosti fosfolipidů krevní plasmy dospělého člověka (*Glade a Smith, 2015*). Do značné míry je skrytý uvnitř buňky a pouze za výjimečných okolností je vystaven extracelulárnímu prostředí. Když dojde k aktivaci krevních destiček, je fosfatidylserin přemístěn na vnější povrch membrány. K této translokaci pomáhají enzymy zvané skramblázy. Ty na rozdíl od enzymů flipáz a flopáz, které transportují lipidy jednosměrně v závislosti na ATP, jsou obousměrné a snižují asymetrické uspořádání fosfolipidů v membránách nezávisle na ATP (*Leventis a Grinstein, 2010*).

Fosfatidylserin hraje důležitou roli jak uvnitř tak i vně buňky. Typickým příkladem je hemostáza, ve které má fosfatidylserin klíčový vliv na koagulační kaskádu. Aby byla koagulace krve účinná, je vyžadován protrombotický povrch. Ten umožňuje správnou sestavu protrombinázového komplexu a tvorbu trombinu nutného pro zahájení srážení. Tyto povrchy jsou poskytovány buňkami, které obsahují právě fosfatidylserin (*Litvinov a Weisel, 2016*). Jeho přítomnost na povrchu buněk stimuluje přeměnu protrombinu na trombin, která je zprostředkována koagulačním faktorem Xa a také přítomností vápenatých iontů a faktoru Va (*Vance a Steenbergen, 2005*). Za apoptických podmínek nebo při poškození červených krvinek, způsobené například vysokým smykovým třením, zánětem nebo oxidativním stresem, mohou červené krvinky přijít o asymetrické uspořádání na membráně a tím vystavit fosfatidylserin. Odhalení a uvolnění fosfatidylserinu je zprostředkováno zvýšením toku buněčných  $Ca^{2+}$  iontů, který se zúčastní buněčného stárnutí.

Díky velkému počtu červených krvinek v krvi je i malá část erytrocytů s fosfatidylserinem důvodem ke vzniku protrombotických podmínek. Dokonce i u zdravých jedinců 0,5-0,6% populace červených krvinek exprimuje fosfatidylserin a tím poskytuje aktivní povrch pro aktivaci protrombinu. Tato populace erytrocytů může představovat až 40% krve schopné vytvářet trombin. Předpokládá se, že abnormální expozice fosfatidylserinu má za následek opakované vytváření a rušení srpkovitého tvaru buněk, který je spojený s polymerizací a depolymerizací mutovaného hemoglobinu. Zvýšená expozice fosfatidylserinu u pacientů s B-talasémií je spojena s eryptózou, úmrtím červených krvinek (*Litvinov a Weisel, 2016*). Vzhledem k silné odpovědi fosfatidylserinu na povrchu krevních destiček a apoptických buněk, je zřejmé, že jeho nevhodné vystavení může mít za následek různé patologické stavy, jako jsou anémie či nemoci spojené s hyperkoagulabilitou krve (*Schlegel a Williamson, 2001*).

### 3.3.2 Vliv mikročástic na koagulaci

Aktivace, stárnutí a apoptóza buněk, včetně červených krvinek, jsou doprovázeny tvorbou mikroskopických membránových struktur zvaných mikrovezikuly či mikročástice. Schopnost buněk vytvářet mikročástice *in vivo* je důležitá pro regulaci fyziologických reakcí, dále je to prostředek pro mezibuněčnou komunikaci a také se jedná o patogenní složku mnoha nemocí, které ovlivňují hemostázu a trombózu. Tvorba mikročástic z erytrocytů je typická pro uchovávání krve *ex vivo* a akumulace mikročástic je odpovědná za zvýšený výskyt těžkých cévních trombóz, které následují po transfúzi „starých“ erytrocytů. Zvýšený počet cirkulujících mikročástic vzniklých z červených krvinek byl zjištěn u nemocí jako je srpkovitá a hemolytická anémie. Bez ohledu na jejich příčinu vzniku, je zvýšená hladina mikročástic v plazmě spojena se zkráceným časem srážení a nárůstem tvorby trombinu. To poukazuje na schopnost mikročástic zvýšit hemostázu (Litvinov a Weisel, 2016). Poškozené erytrocyty také uvolňují buněčné složky jako je „volný“ hem. Tento hem zvyšuje aktivitu enzymu hemoxygenáza, vytváří reaktivní formy kyslíku a aktivuje endotel a makrofágy díky Toll receptorům. Hemoglobin, který se uvolní lýzou erytrocytů je pro mnoho buněk a tkání toxický, převážně pro ledviny. Mikročástice získané z erytrocytů jsou schopné aktivovat koagulaci částečně expozicí fosfatidylserinu, ale také faktorem XII potřebným na vytváření trombinu. Mikročástice také přenášejí hem k endotelu a tím se indukuje oxidační stres a apoptóza. Dále podporují vazookluzi, regulují antikoagulační funkci proteinu C a zesilují systémový zánět díky komplementovému systému, který je aktivován pomocí trombinu (Villa, Muzykantov a Cines, 2016).

### 3.3.3 Hemolýza a její vliv na koagulaci

Více nebo méně rozsáhlé *in vivo* hemolýzy (rozklad červených krvinek) jsou spojené s uvolněním extracelulárního hemoglobinu do krve. To je patologickým základem pro dědičné a získané hemolytické anémie rozdílné etiologie, přičemž nejčastější příčina vzniku je imunologická hemolýza. Existuje mnoho patogenních mechanismů, kdy může hemolýza vést až k intravaskulární koagulaci. Za prvé, jak již bylo řečeno, poškozené červené krvinky svým uvolněním volného hemu a hemoglobinu „vychytávají“ NO a tím podporují aktivaci endotelových buněk a adhezi/agregaci krevních destiček (Litvinov a Weisel, 2016). Když je hemoglobin uvnitř červené krvinky, je reakce mezi hemoglobinem a NO omezena permeabilitou buněčné membrány. Vrstva okolo erytrocytů a tlakový gradient tlačí erytrocyty směrem ke středu cévy a vytváří se zóna, kdy poblíž endotelu produkující NO se nenachází



žádné buňky. Proto hemoglobin, který se uvolní během hemolýzy, zachytává NO 1000krát rychleji a účinněji než uzavřený uvnitř červené krvinky (*Helms, Marvel, Zhao, et al., 2013*). Volný hem dále zvyšuje aktivitu enzymu oxygenáza, vytváří reaktivní formu kyslíku a přímo aktivuje endotelové buňky a makrofágy. Za druhé, imunologická hemolýza je spojena s produkcí TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), který má za následek expresi tkáňového faktoru v endotelových buňkách a také snižuje endotelovou expresi trombomodulinu, což je silný kofaktor trombinu. Jako poslední mechanismus, kdy hemolýza vede ke zlepšení koagulace, je masivní uvolnění mikročástic z červených krvinek (*Litvinov a Weisel, 2016*).

## 4. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo podat informace o hemostáze a přiblížit děje, které jsou její součástí. Na první pohled jednoduchý proces zástavy krvácení je příkladem složitosti a dokonalé propracovanosti lidského těla. Je zde ukázáno, že i miniaturní buňka, jakou je erytrocyt, může mít zásadní vliv na fungování životně důležité zástavy krvácení. A to díky mnoha faktorům, jako je složení buněčné membrány, obsah povrchových adhezních receptorů a schopnost pozoruhodně měnit tvar.

Ačkoliv je role erytrocytů známa už několik desítek let a jeho inkorporace v hemostáze byla využívána již ve středověku, způsob a mechanismus, jakým se tohoto procesu účastní, je stále podrobně studován. Dle mého názoru je studium role erytrocytů při hemostáze zásadní, jelikož znalost jejich funkce poskytuje rozvoj antitrombotické a protizánětlivé léčby a tím i kladně ovlivňuje působení nynějších léků. V neposlední řadě nám tato znalost umožňuje vyvíjet nové teorie, jak zmírnit vliv červených krvinek v trombóze a dalších intravaskulárních patologiích.

## 5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. PASRICHA, Sant-Rayn. The Red Cell Membrane, Part 1: The Role of the Red Cell Membrane. *Clinical Advances in Hematology & Oncology* [online]. 2014, 2014(8), 1-3 [cit. 2017-01-17].
2. SETTY, B. N. Y. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* [online]. **99**(5), 1564-1571 [cit. 2017-01-17]. DOI: 10.1182/blood.V99.5./.
3. TELEN, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood* [online]. 2016, **127**(7), 810-819 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1182/blood-2015-09-618553. ISSN 0006-4971.
4. GOEL, M. S. Adhesion of normal erythrocytes at depressed venous shear rates to activated neutrophils, activated platelets, and fibrin polymerized from plasma [online]. [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0712. ISBN 10.1182/blood-2002-03-0712.
5. GUYTON, Arthur C. a John E. HALL. Textbook of medical physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, c2006. ISBN 07-216-0240-1.
6. MOHANDAS, N. a P. G. GALLAGHER. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* [online]. 2008, **112**(10), 3939-3948 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1182/blood-2008-07-161166. ISBN 10.1182/blood-2008-07-161166. ISSN 0006-4971.
7. TSE, W. a S. LUX. Red Blood Cell Membrane Disorders. *British journal of haematology* [online]. 1999, **104**(1), 2-13 [cit. 2017-03-18]. ISSN 0007-1048.
8. LI, He a George LYKOTRAFITIS. *Two-Component Coarse-Grained Molecular-Dynamics Model for the Human Erythrocyte Membrane* [online]. 2012 [cit. 2017-03-18]. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.4012. ISBN 10.1016/j.bpj.2011.11.4012.
9. YAWATA, Yoshihito. *Cell membrane: the red blood cell as a model*. Weinheim: Wiley-VCH, c2003. ISBN 35-273-0463-0.
10. ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 08-153-3218-1.
11. ZHANG, Rui, ChenYu ZHANG, Qi ZHAO a DongHai LI. Spectrin: Structure, function and disease. *Science China Life Sciences* [online]. 2013, **56**(12), 1076-1085 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1007/s11427-013-4575-0. ISSN 1674-7305.

12. BENNETT, V a S LAMBERT. *The spectrin skeleton: from red cells to brain* [online]. 1991 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1172/JCI115157. ISBN 10.1172/JCI115157. 7.
13. DEBAUGNIES, France, Frédéric COTTON, Charles BOUTIQUE a Béatrice GULBIS. Erythrocyte membrane protein analysis by sodium dodecyl sulphate-capillary gel electrophoresis in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. 2011, **49**(3), - [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1515/CCLM.2011.066. ISSN 1437-4331.
14. BURTON, Nicholas M. a Lesley J. BRUCE. *Modelling the structure of the red cell membrane* This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled *CSBMCB 53rd Annual Meeting — Membrane Proteins in Health and Disease*, and has undergone the Journal's usual peer review process [online]. 2011 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1139/O10-154. ISBN 10.1139/O10-154.
15. CZOGALLA, Aleksander, Adrian R. JASZEWSKI, Witold DIAKOWSKI, Ewa BOK, Adam JEZERSKI a Aleksander F. SIKORSKI. Structural insight into an ankyrin-sensitive lipid-binding site of erythroid  $\beta$ -spectrin. *Molecular Membrane Biology* [online]. 2007, **24**(3), 215-224 [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1080/09687860601102427. ISSN 0968-7688.
16. FERREIRA, Cláudia Natália, Marinez de Oliveira SOUSA, Luci Maria Sant'Ana DUSSE a Maria das Graças CARVALHO. *O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações* [online]. 2010 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1590/S1516-84842010000500016. ISBN 10.1590/S1516-84842010000500016.
17. HOFFMAN, Maureane a Dougald M. MONROE III. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2001, **85**(6) [cit. 2017-03-23].
18. SMITH, Stephanie A. *The cell-based model of coagulation* [online]. 2009 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x. ISBN 10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x.
19. HOFFMAN, Maureane. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Reviews* [online]. 2003, **17**, S1-S5 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1016/S0268-960X(03)90000-2. ISSN 0268960x.
20. YAU, Jonathan W., Hwee TEOH a Subodh VERMA. *Endothelial cell control of thrombosis* [online]. 2015 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1186/s12872-015-0124-z. ISBN 10.1186/s12872-015-0124-z.

21. PÉREZ-GÓMEZ, Francisco a Ramón BOVER. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. *Revista Espanola de Cardiologia* [online]. 2007, **60**(12), 1217-1219 [cit. 2017-03-26]. ISSN 255.
22. WANG, Yiming, Marc ANDREWS, Yan YANG, et al. *Platelets in Thrombosis and Hemostasis: Old Topic with New Mechanisms* [online]. 2012, **12**(2) [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.2174/1871529X11202020126. ISBN 10.2174/1871529X11202020126.
23. HOU, Yan, Naadiya CARIMM, Yiming WANG, Reid C. GALLANT, Alexandra MARSHALL a Heyu NI. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectinmediated protein wave of hemostasis. *Journal of Biomedical Research* [online]. 2015, **29**, 437-444 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.7555/JBR.29.20150121. ISBN 10.7555/JBR.29.20150121. ISSN 16748301.
24. JURK, Kerstin a Beate E KEHREL. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis* [online]. 2005, **31**(4), 381-392 [cit. 2017-03-27]. DOI: 10.1055/s-2005-916671. ISBN 10.1055/s-2005-916671.
25. NAKAHATA, Norimichi. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology* [online]. 2008, **118**(1), 18-35 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.01.001. ISSN 01637258.
26. NORRIS, Lucy A. Blood coagulation. *Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* [online]. 3, 2003, (17), 369-383 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1053/S1521-6934(03)00014-2.
27. PALTA, Sanjeev, Richa SAROA a Anshu PALTA. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia* [online]. 2014, **58**(5), 515-523 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.4103/0019-5049.144643. ISBN 10.4103/0019-5049.144643.
28. TSIFTSOGLU, Asterios S., Ioannis S. VIZIRIANAKIS a John STROUBOULIS. Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* [online]. 2009, **61**(8), 800-830 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1002/iub.226. ISBN 10.1002/iub.226.
29. KOURY, Mark J. a Prem PONKA. NEW INSIGHTS INTO ERYTHROPOIESIS: The Roles of Folate, Vitamin B12 , and Iron. *Annual Review of Nutrition* [online]. 2004, **24**(1), 105-131 [cit. 2017-03-30]. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306. ISBN 0.1146/annurev.nutr.24.012003.132306.

30. IPSARO, J. J. a A. MONDRAGON. Structural basis for spectrin recognition by ankyrin. *Blood* [online]. 2010, **115**(20), 4093-4101 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1182/blood-2009-11-255604. ISBN 10.1182/blood-2009-11-255604.
31. KÜMPORNSIN, Krittikorn, Surasak JIEMSUP, Suganya YONGKIETTRAKUL a Thanat CHOOKAJORN. Characterization of band 3–ankyrin–Protein 4.2 complex by biochemical and mass spectrometry approaches. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2011, **406**(3), 332-335 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.026. ISBN 10.1016/j.bbrc.2011.02.026.
32. SATCHWELL, Timothy J., Debbie K. SHOEMARK, Richard B. SESSIONS a Ashley M. TOYE. Protein 4.2: A complex linker. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* [online]. 2009, **42**(3), 201-210 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1016/j.bcnd.2009.01.005. ISBN 10.1016/j.bcnd.2009.01.005.
33. CUNHA, Shane R. a Peter J. MOHLER. Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2009, **13**(11-12), 4364-4376 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00943.x. ISBN 10.1111/j.1582-4934.2009.00943.x.
34. DIAKOWSKI, Witold, Michał GRZYBEK a Aleksander F. SIKORSKI. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochemica et Cytobiologica* [online]. 2006, **44**(4), 231-248 [cit. 2017-04-02].
35. FLAHERTY, K. M., D. B. MCKAY, W. KABSCH a K. C. HOLMES. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1991, **88**(11), 5041-5045 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1073/pnas.88.11.5041. ISBN 10.1073/pnas.88.11.5041.
36. COOPER., Geoffrey M. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2000. ISBN 978-087-8931-026.
37. BARNEAUD-ROCCA, D., C. ETCHEBEST a H. GUIZOUARN. Structural Model of the Anion Exchanger 1 (SLC4A1) and Identification of Transmembrane Segments Forming the Transport Site. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2013, **288**(37), 26372-26384 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1074/jbc.M113.465989. ISBN 10.1074/jbc.M113.465989.

38. POOLE, J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood* [online]. 2000, **14**(1), 31-43 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1054/blre.1999.0124. ISBN 10.1054/blre.1999.0124.
39. AGARWAL, SK a A GUPTA. Aquaporins: The renal water channels. *Indian Journal of Nephrology* [online]. 2008, **18**(3), 95-100 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.4103/0971-4065.43687. ISBN 10.4103/0971-4065.43687.
40. PELAGALLI, Alessandra, Caterina SQUILLACIOTI, Nicola MIRABELLA a Rosaria MELI. Aquaporins in Health and Disease: An Overview Focusing on the Gut of Different Species. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(8), 1213 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.3390/ijms17081213. ISBN 10.3390/ijms17081213.
41. VERKMAN, A.S. Aquaporins in Clinical Medicine. *Annual Review of Medicine* [online]. 2012, **63**(1), 303-316 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1146/annurev-med-043010-193843. ISSN 0066-4219.
42. CHASIS, J. A. a N. MOHANDAS. Red blood cell glycophorins. *Blood* [online]. 1992, **80**(8), 1869-1879 [cit. 2017-04-04].
43. VILLA, C. H., V. R. MUZYKANTOV a D. B. CINES. The emerging role for red blood cells in haemostasis: opportunity for intervention. *ISBT Science Series* [online]. 2016, **11**(S1), 158-164 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1111/voxs.12197. ISSN 17512816.
44. LODISH, Harvey F., BERK A., ZIPURSKY S. L. et al. *Molecular cell biology: Cell-Cell Adhesion and Communication* [online]. 4th ed. New York: W.H. Freeman, c2000 [cit. 2017-04-25]. ISBN 07-167-3136-3.
45. BARSHEIN, Gregory, Ronen BEN-AMI a Saul YEDGAR. Role of red blood cell flow behavior in hemodynamics and hemostasis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* [online]. 2007, **5**(4), 743-752 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1586/14779072.5.4.743. ISBN 10.1586/14779072.5.4.743
46. BASKURT, O. a H. MEISELMAN. Blood Rheology and Hemodynamics. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2003, **29**(5), 435-450 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1055/s-2003-44551. ISBN 10.1055/s-2003-44551.
47. CHIEN, S. Red Cell Deformability and its Relevance to Blood Flow. *Annual review of physiology* [online]. 1987, **49**(1), 177-192 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1146/annurev.ph.49.030187.001141. ISBN 10.1146/annurev.ph.49.030187.001141.
48. BASKURT, O., H. MEISELMAN a M. SIMMONDS. Blood rheology and aging. *Journal of Geriatric Cardiology* [online]. 2013, **10**(3), 291-301 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.3969/j.issn.1671-5411.2013.03.010.

49. LITVINOV, R. I. a J. W. WEISEL. Role of red blood cells in haemostasis and thrombosis. *International Society of Blood Transfusion* [online]. 2016, **12**(1), 176-183 [cit. 2017-04-12]. DOI: 10.1111/voxs.12331. ISBN 10.1111/voxs.12331.
50. VALLÉS, J. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha IIb beta 3 integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* [online]. 2002, **99**(11), 3978-3984 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1182/blood.V99.11.3978. ISSN 00064971.
51. YEH, J.-J., S. TSAI, D.-C. WU, J.-Y. WU, T.-C. LIU a A. CHEN. P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during *Helicobacter pylori* infection. *Blood* [online]. 2010, **115**(21), 4247-4253 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1182/blood-2009-09-241166. ISBN 10.1182/blood-2009-09-241166.
52. YANG, Y., S. KOO, C. S. LIN a B. NEU. Specific Binding of Red Blood Cells to Endothelial Cells Is Regulated by Nonadsorbing Macromolecules. *The Journal of biological chemistry* [online]. 2010, **285**(52), 40489-40495 [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.1074/jbc.M110.116608. ISBN 10.1074/jbc.M110.116608.
53. ALAPAN, Yunus, Jane A. LITTLE a Umut A. GURKAN. Heterogeneous Red Blood Cell Adhesion and Deformability in Sickle Cell Disease. *Scientific reports* [online]. 2014, **4**(7173) [cit. 2017-05-02]. ISBN 10.1038/srep07173.
54. CINES, D. B., T. LEBEDEVA, C. NAGASWAMI, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood* [online]. 2014, **123**(10), 1596-1603 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1182/blood-2013-08-523860. ISBN 10.1182/blood-2013-08-523860.
55. LEVENTIS, Peter A. a Sergio GRINSTEIN. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annual Review of Biophysics* [online]. 2010, **39**(1), 407-427 [cit. 2017-05-26]. DOI: 10.1146/annurev.biophys.093008.131234. ISBN 10.1146/annurev.biophys.093008.131234.
56. VANCE, J a R STEENBERGEN. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research* [online]. 2005, **44**(4), 207-234 [cit. 2017-05-30]. DOI: 10.1016/j.plipres.2005.05.001. ISBN 10.1016/j.plipres.2005.05.001.
57. SCHLEGEL, R A a P WILLIAMSON. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2001, **8**(6), 551-563 [cit. 2017-05-30]. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400817. ISBN 10.1038/sj.cdd.4400817.



58. TELEN, Marilyn J. Red blood cell surface adhesion molecules: Their possible roles in normal human physiology and disease. *Seminars in hematology* [online]. 2000, **37**(2), 130-142 [cit. 2017-05-31]. DOI: 10.1016/S0037-1963(00)90038-6. ISBN 10.1016/S0037-1963(00)90038-6.
59. ULYANOVA, T., Linda M. SCOTT, Gregory V. PRIESTLEY, Yi JIANG, Betty NAKAMOTO, Koni A. PANDELAKIS a Thalia PAPAYANNOPOULOU. VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* [online]. 2005, **106**(1), 86-94 [cit. 2017-06-01]. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3417. ISBN 10.1182/blood-2004-09-3417.
60. COOK-MILLS, Joan M., Michelle E. MARCHESE a Hiam ABDALA-VALENCIA. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants and Redox Signaling* [online]. 2011, **15**(6), 1607-1638 [cit. 2017-06-01]. DOI: 10.1089/ars.2010.3522. ISBN 10.1089/ars.2010.3522.
61. COLLEC, Emmanuel, Marie-Christine LECOMTE, Wassim EL NEMER, Yves COLIN a Caroline LE VAN KIM. Novel role for the Lu/BCAM–spectrin interaction in actin cytoskeleton reorganization. *Biochemical Journal* [online]. 2011, **436**(3), 699-708 [cit. 2017-06-01]. DOI: 10.1042/BJ20101717. ISBN 10.1042/BJ20101717.
62. EL NEMER, W., Y. COLIN a C. LE VAN KIM. Role of Lu/BCAM glycoproteins in red cell diseases. *Transfusion clinique et biologique* [online]. 2010, **17**(3), 143-147 [cit. 2017-06-01]. DOI: 10.1016/j.tracli.2010.06.002. ISBN 10.1016/j.tracli.2010.06.002.
63. MIYAZAKI, Takamichi, Sugiko FUTAKI, Kouichi HASEGAWA, et al. Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2008, **375**(1), 27-32 [cit. 2017-06-02]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.07.111. ISBN 10.1016/j.bbrc.2008.07.111.
64. COLOGNATO, H. a P. YURCHENCO. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Developmental Dynamics* [online]. 2000, **218**(1), 213-234 [cit. 2017-06-02]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<213::AID-DVDY1>3.0.CO;2-R.

65. HERMAND, Patricia, Pierre GANE, Isabelle CALLEBAUT, Nelly KIEFFER, Jean-Pierre CARTRON a Pascal BAILLY. Integrin receptor specificity for human red cell ICAM-4 ligand. *European journal of biochemistry / FEBS* [online]. 2004, **271**(18), 3729-3740 [cit. 2017-06-02]. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04313.x. ISBN 10.1111/j.1432-1033.2004.04313.x.
66. LIU, Zhaofei, Fan WANG a Xiaoyuan CHEN. Integrin  $\alpha v \beta 3$  -targeted cancer therapy. *Drug development research* [online]. 2008, **69**(6), 329-339 [cit. 2017-06-02]. DOI: 10.1002/ddr.20265. ISBN 10.1002/ddr.20265.
67. HELMS, C. C., M. MARVEL, W. ZHAO, et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2013, **11**(12), 2148-2154 [cit. 2017-06-13]. ISBN 10.1111/jth.12422.
68. GLADE, Michael J. a Kyl SMITH. Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition* [online]. 2015, **31**(6), 781-786 [cit. 2017-06-13]. DOI: 10.1016/j.nut.2014.10.014. ISBN 10.1016/j.nut.2014.10.014.