UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

AGREGACE KREVNÍCH DESTIČEK U PACIENTŮ S DIABETES MELLITUS II. TYPU

PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Hradec Králové 2025 Lucie Lichnerová

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Hradec Králové 2025

Lucie Lichnerová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala PharmDr. Alejandru Carazovi, Ph.D. za ochotu, cenné rady a odbornou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Lukášovi Konečnému za pomoc při práci na experimentální části. Velké poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mě během celého studia motivovali a podporovali.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lucie Lichnerová

Školitel: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Název diplomové práce: Agregace krevních destiček u pacientů s diabetes mellitus II. typu

Diabetes mellitus II. typu je chronické metabolické onemocnění charakterizované poruchou metabolismu glukózy, které často vede k cévním komplikacím a zvýšenému riziku trombotických příhod. Jedním z faktorů tohoto rizika je změna reaktivity trombocytů. Cílem práce bylo analyzovat a zhodnotit, jak trombocyty pacientů s diabetem II. typu reagují na různé agonisty ve srovnání s destičkami zdravých jedinců. *Ex vivo* byly testovány induktory působící prostřednictvím odlišných signalizačních drah, aby bylo možné podrobněji zmapovat mechanismy aktivace destiček: kyselina arachidonová (AA), kolagen, ADP, analog tromboxanu A_2 (U-46619), ristocetin a peptid působící na trombinový receptor (TRAP). Agregace byla měřena pomocí impedanční agregometrie ve vzorcích krve odebraných nalačno od 45 pacientů s diabetem a 53 zdravých dobrovolníků. Výsledky ukázaly, že odpověď trombocytů u diabetiků není jednotná. Významné rozdíly byly pozorovány pouze u tří induktorů. Vyšší agregace byla zaznamenána u vzorků stimulovaných AA a ristocetinem, zatímco po stimulaci kolagenem byla u pacientů s diabetem agregace nižší. Tyto výsledky naznačují, že celková reaktivita destiček u diabetiků není systematicky zvýšena, ale dochází k cílenému ovlivnění určitých signalizačních drah trombocytů.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucie Lichnerová

Supervisor: PharmDr. Alejandro Carazo, Ph.D.

Title of diploma thesis: Platelet aggregation in patients with type 2 diabetes mellitus

Type 2 diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder characterized by impaired glucose metabolism, which often leads to vascular complications and an increased risk of thrombotic events. One factor contributing to this risk is altered platelet reactivity. The aim of this study was to analyze and evaluate how platelets from patients with type 2 diabetes respond to various agonists compared to the platelets from healthy individuals. *Ex vivo*, inducers acting through distinct signaling pathways were tested to more comprehensively map the mechanisms of platelet activation: arachidonic acid (AA), collagen, ADP, thromboxane A_2 analogue (U-46619), ristocetin, and thrombin receptor-activating peptide (TRAP). Aggregation was measured using impedance aggregometry in fasting blood samples obtained from 45 patients with diabetes and 53 healthy volunteers. The results showed that platelet responses in diabetic patients are heterogeneous. Statistically significant differences were observed for only three inducers. Higher aggregation was observed in samples stimulated with AA and ristocetin, whereas collagen-stimulated samples exhibited lower aggregation in diabetic patients. These findings suggest that overall platelet reactivity in patients with diabetes is not systematically increased, but there is a targeted effect on specific platelet signaling pathways.

Obsah

1 SEZNAM ZKRATEK ... 1

2 ÚVOD ... 2

3 TEORETICKÁ ČÁST ... 3

3.1 KREVNÍ DESTIČKY ... 3

3.1.1 Funkce trombocytů ... 3

3.1.2 Vznik krevních destiček ... 4

3.1.3 Struktura krevních destiček ... 5

3.1.4 Receptory krevních destiček ... 7

3.1.5 Hemostáza ... 10

3.2 PROTIDESTIČKOVÁ LÉČIVA ... 13

3.2.1 Inhibitory cyklooxygenázy ... 14

3.2.2 Inhibitory receptoru $P2Y_{12}$ ... 15

3.2.3 Inhibitory glykoproteinového receptoru GP IIb/IIIa ... 17

3.2.4 Inhibitory fosfodiesterázy ... 18

3.2.5 Inhibitory trombinových receptorů ... 18

3.3 DIABETES MELLITUS II. TYPU ... 19

3.3.1 Epidemiologie ... 19

3.3.2 Patofyziologie ... 20

3.3.3 Komplikace diabetu ... 20

3.3.4 Farmakoterapie diabetu II. typu ... 21

3.4 AKTIVITA KREVNÍCH DESTIČEK U PACIENTŮ S DIABETEM MELLITUS ... 25

4 CÍL PRÁCE ... 26

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ... 27

5.1 ODBĚR VZORKU ... 27

5.2 CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ ... 27

5.3 POUŽITÝ MATERIÁL ... 34

5.4 IMPEDANČNÍ AGREGOMETRIE ... 34

5.5 METODIKA MĚŘENÍ AGREGACE TROMBOCYTŮ ... 35

5.5.1 Příprava činidel před experimentem ... 35

5.5.2 Průběh experimentu ... 37

5.5.3 Statistická analýza ... 37

6 VÝSLEDKY ... 38

6.1 AGREGACE TROMBOCYTŮ INDUKOVANÁ AA ... 39

6.2 AGREGACE TROMBOCYTŮ INDUKOVANÁ KOLAGENEM ... 40

6.3 AGREGACE TROMBOCYTŮ INDUKOVANÁ RISTOCETINEM ... 41

6.4 AGREGACE TROMBOCYTŮ INDUKOVANÁ ADP ... 42

6.5 AGREGACE TROMBOCYTŮ INDUKOVANÁ TRAP ... 43

6.6 AGREGACE TROMBOCYTŮ INDUKOVANÁ U-46619 A PAF ... 44

7 DISKUSE ... 45

8 ZÁVĚR ... 48

9 LITERATURA ... 49

1 Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová
AKS	akutní koronární syndrom
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
COX	cyklooxygenáza
DAG	diacylglycerol
DM	diabetes mellitus
DMS	demarkační membránový systém
DTS	denzní tubulární systém
G-CSF	kolonie stimulující faktor pro granulocytární vývojovou řadu (z angl. granulocyte-colony stimulating factor)
GP	glykoprotein
GPCR	receptory spřaženy s G proteinem (z angl. G protein-coupled receptor).
HSC	hematopoetická kmenová buňka (z angl. Hematopoietic stem cell)
iCMP	ischemická cévní mozková příhoda
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
IP3	inositol-1,4,5-trifosfát
IR	inzulinová rezistence
MK	megakaryocyt
NSAID	nesteroidní antiflogistika
PAD	perorální antidiabetika
PAF	destičkový aktivační faktor
PCI	perkutánní koronární intervence
PDGF	destičkový růstový faktor (z angl. Platelet-derived growth factor)
PG	prostaglandin
T2DM	diabetes mellitus 2.typu
vWF	von Willebrandův faktor

2 Úvod

Krevní destičky, také nazývané trombocyty, jsou malé bezjaderné krevní buňky vznikající z megakaryocytů v kostní dřeni. Mají klíčovou roli v procesu hemostázy. Po poranění cévní stěny dochází k jejich aktivaci, přilnutí k místu poškození a uvolnění mediátorů podporujících tvorbu trombu, čímž je zajištěna zástava krvácení. Kromě této zásadní funkce se krevní destičky podílejí také na řadě dalších funkcí v rámci fyziologických i patologických procesů, například při zánětlivé odpovědi, imunitních reakcích, růstu a metastazování nádorů.

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu agregace krevních destiček u pacientů s diabetem mellitus II. typu, což je chronické metabolické onemocnění charakterizované dlouhodobě zvýšenou hladinou glukózy v krvi (hyperglykémií). Využitím impedanční agregometrie byla hodnocena míra agregace po stimulaci sedmi různými induktory. Jako induktory byly použity tyto látky: kyselina arachidonová, kolagen, ADP, TRAP, ristocetin, PAF a U-46619.

3 Teoretická část

3.1 Krevní destičky

Krevní destičky představují nejmenší krevní buňky o průměru přibližně 1–3 μm s charakteristickým diskovitým tvarem a bezjadernou strukturou. (Machlus a Italiano 2013) Počet trombocytů se za fyziologických podmínek pohybuje v rozmezí 150-450 × 10^9 na litr krve, čímž se po erytrocytech řadí k druhým nejpočetnějším krevním buňkám. (Langelier 2019) Jejich životnost je 7 až 10 dní, poté jsou eliminovány především makrofágy ve slezině a játrech. (Franco et al. 2015)

3.1.1 Funkce trombocytů

Trombocyty hrají důležitou roli v procesu hemostázy, při níž dochází k zástavě krvácení z poškozené cévní stěny. Změny v jejich počtu nebo funkci mohou vést ke krvácení i k život ohrožujícím stavům, jako je trombóza, infarkt myokardu či cévní mozková příhoda. (Reusswig et al. 2024)

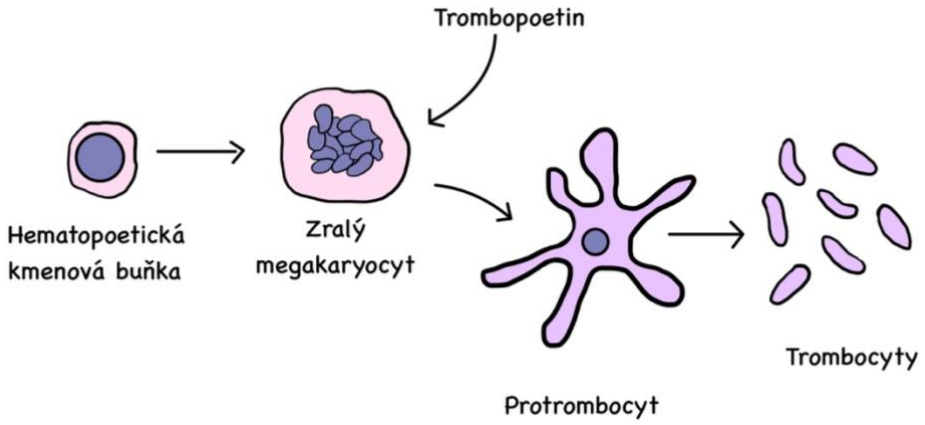
Kromě své role v hemostáze a trombóze se krevní destičky významně podílejí také na imunitní odpovědi organismu. Pomocí toll-like receptorů (TLR) jsou schopny rozpoznávat patogeny a reagovat na ně uvolněním zánětlivých a protizánětlivých mediátorů prostřednictvím signálních molekul. Ovlivňují jak vrozenou, tak adaptivní imunitu. (Franco et al. 2015) Imunitní funkce krevních destiček mohou být v některých případech ochranné, zatímco jindy přispívají k nepříznivým zánětlivým procesům. Po jejich aktivaci dochází k uvolnění granul obsahujících prozánětlivé mediátory. Krevní destičky jsou tak spojovány se zánětlivými procesy. (Theofilis et al. 2022)

Dále hrají zásadní roli při formaci neutrofilních extracelulárních pastí (*NETs – neutrophil extracellular traps*), což jsou vlákna tvořená neutrofily, která zachycují cirkulující mikroorganismy a omezují jejich kolonizační schopnost. Tato struktura zároveň podporuje metastatické šíření nádorových buněk. (Franco et al. 2015) Krevní destičky hrají důležitou roli také v růstu nádorů a jejich metastazování. V nádorovém mikroprostředí jsou destičky aktivovány a agregovány nádorovými buňkami a podporují jejich přežití tím, že je chrání před buňkami imunitního prostředí. Zároveň umožňují nádorovým buňkám adhezi ke stěně cév a usnadňují jejich pronikání do vzdálených tkání. (Liao et al. 2023)

3.1.2 Vznik krevních destiček

Krevní destičky vznikají z cytoplazmy megakaryocytů (MK) v kostní dřeni a jejich vývoj je řízen trombopoetinem, hormonem produkovaným převážně játry. Působením trombopoetinu, společně s interleukiny (IL-1, IL-3, IL-6) a faktorem stimulujícím granulocyty a makrofágy (GM-CSF), dochází k diferenciaci hematopoetických kmenových buněk (HSC – *hematopoietic stem cells*) na MK prostřednictvím několika vývojových stadií (Obr.1). (Křížková et al. 2021) HSC se nacházejí převážně v kostní dřeni, avšak během raného vývoje jsou přítomny také ve žloutkovém váčku, fetálních játrech a slezině. (Machlus a Italiano 2013)

První fází je megakaryopoéza, během níž se z HSC vyvíjejí zralé MK. (Yu a Cantor 2012) Vývoj zralého MK trvá 5-10 dní. (Křížková et al. 2021) Druhou fází je trombopoéza, při níž dochází k tvorbě a uvolňování jednotlivých trombocytů ze zralého MK. (Yu a Cantor 2012) Zralý MK se již dále nedělí, dochází pouze k mnohonásobnému zmnožení genomu v jádře, tzv. endomitóze. (Penka a Tesařová 2011) Následně vznikají invaginace plazmatické membrány, které se navzájem propojují a vytvářejí demarkační membránový systém (DMS). Ten rozděluje cytoplazmu na menší ohraničené oblasti označované jako protrombocyty. (Křížková et al. 2021; Penka a Tesařová 2011) Protrombocyty jsou nezralé krevní destičky vybavené cytoplazmatickými výběžky, které se postupně prodlužují, ztenčují a větví. Tyto výběžky, tvořené cytoplazmou MK, prostupují endotelem kostní dřeně a zasahují do kapilárního systému sinusoid, kde dochází k odlamování jejich koncových částí. Ty se následně v podobě trombocytů uvolňují do krevní cirkulace. (Machlus a Italiano 2013)



Obrázek 1. Diferenciace hematopoetické kmenové buňky

(Vlastní ilustrace inspirována obrázkem z Wikiskripta)

3.1.3 Struktura krevních destiček

Povrch krevní destičky tvoří **plazmatická membrána**, na jejíž vnější straně se nachází glykokalyx. Glykokalyx je složený z glykoproteinů a proteoglykanů. (Reitsma et al. 2007) Membrána je tvořena relativně hladkou lipidovou dvojvrstvou (Machlus a Italiano 2013), jejíž hlavními složkami jsou fosfolipidy. (Duttaroy 2018) V klidovém stavu se na vnější straně membrány nachází především neutrální fosfatidylcholin a sfingomyelin, zatímco na vnitřní straně převažují aniontový fosfatidylserin, fosfatidylinositol a fosfatidylethanolamin, které nepřicházejí do styku s krví. Fosfatidylinositol je zároveň zdrojem kyseliny arachidonové (AA), která se během aktivace destiček metabolizuje na prostaglandiny, leukotrieny a tromboxan. (Duttaroy 2018) Hladká lipidová dvojvrstva vytváří hluboké invaginace do cytoplazmy za vzniku **otevřeného kanalikulárního systému (OCS)**. (Michelson 2011) Tento systém zvětšuje povrch destičky. (Chottová Dvořáková a Mistrová 2018)

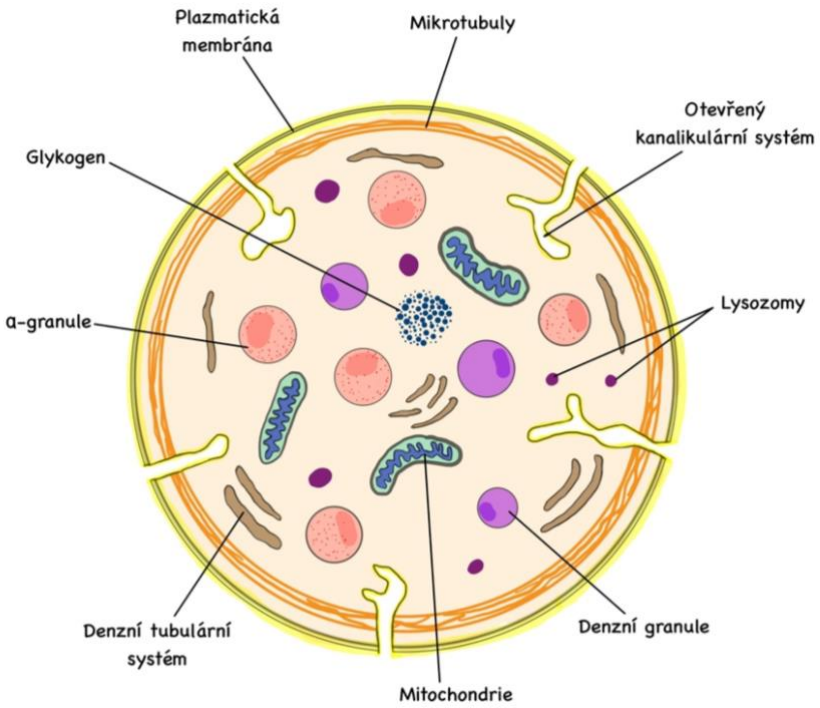
Cytoskelet je zodpovědný za udržování diskovitého tvaru klidové krevní destičky. Během její aktivace dochází k reorganizaci cytoskeletu a diskovitý tvar se mění na kulovitější. Následně destičky získávají nepravidelný tvar díky tvorbě pseudopodií, které podporují jejich adhezi a síření na poškozeném povrchu. V trombocytech existují dva cytoskeletální polymerní systémy – mikrotubuly tvořené tubuliny a mikrofilamenta tvořená aktinovými vlákny. (Cuenca-Zamora et al. 2019) Mikrotubuly jsou uspořádány po obvodu destičky pod plazmatickou membránou, kde vytvářejí mikrotubulární spirálu, která zachovává její diskoidní tvar. (Cuenca-Zamora et al. 2019; Gremmel et al. 2016) Při aktivaci destiček dochází k expanzi spirály, ale kvůli omezenému prostoru v destičce se mikrotubuly svíjejí do středu aktivované buňky, což mění její morfologii. (Cuenca-Zamora et al. 2019) Aktin je nejhojnějším proteinem destiček a vytváří jak membránový skelet, tak i vnitřní trojrozměrnou síť, která udržuje organely oddělené od sebe navzájem i od buněčné stěny v klidové buňce. (Glenn et al. 1996; Gremmel et al. 2016) Po aktivaci aktinový systém přesouvá denzní a α-granule do středu destiček, což umožňuje sekreci jejich obsahu otevřeným kanalikulárním systémem. (Gremmel et al. 2016)

V cytoplazmě trombocytů se nacházejí tři hlavní typy sekrečních organel: α-granule, denzní granule a lysozomy. Nejpočetnějšími z nich jsou **α-granule**. Obsahují širokou škálu proteinů, důležitých pro primární hemostázu, a dalších adhezivních proteinů, jako je von Willebrandův faktor (vWF), fibrinogen a koagulační faktory V a XI, které se podílejí na sekundární hemostáze. (Twomey et al. 2018) Dále obsahují plazminogen a destičkový růstový faktor (PDGF). (Gremmel et al. 2016) **Denzní (δ) granule** uchovávají vysoké koncentrace neproteinových molekul, jako jsou adenosintrifosfát (ATP), adenosindifosfát (ADP), histamin,

serotonin a vápník. (Twomey et al. 2018) Posledním typem jsou **lysozomy**, které obsahují lysozomální enzymy (kyselé hydrolázy a proteázy), podílející se na štěpení intracelulárních složek. (Twomey et al. 2018)

Dále jsou v cytoplazmě přítomny **mitochondrie**, které zajišťují syntézu ATP a energetické zásobování buňky. Účastní se také apoptózy destiček a mohou být zdrojem zánětlivých mediátorů. (Twomey et al. 2018)

Kromě OCS má trombocyt i další oddělený membránový systém – **denzní tubulární systém** (DTS), který vzniká z hladkého endoplazmatického retikula MK. Tento systém se skládá z kanálků nepravidelně rozptýlených v cytoplazmě. (Gremmel et al. 2016) Slouží jako vnitřní zásobárna vápníku a místo syntézy prostaglandinů a tromboxanu. (Gerrard et al. 1978) Stavba trombocytu je zobrazena na Obr. 2.



Obrázek 2. Morfologie krevní destičky

(Vlastní ilustrace inspirována obrázkem z Bentfeld-Barker a Baiton 1982)

3.1.4 Receptory krevních destiček

Trombocyty exprimují na svém povrchu široké spektrum receptorů, které jsou nezbytné pro jejich aktivaci, adhezi k poškozenému endotelu, agregaci a interakci s dalšími buňkami a koagulačními faktory. Tyto receptory jsou zároveň cílem protidestičkové léčby. Mezi nejvýznamnější patří receptory pro ADP, trombin, tromboxan A_2 a glykoproteinové receptory (viz obr. 3). (Hashemzadeh et al. 2023; Saboor et al. 2013)

Receptory pro ADP

Adenosindifosfát (ADP) je uvolňován z aktivovaných trombocytů a působí jako agonista dvou purinergních receptorů – $P2Y_1$ a $P2Y_{12}$. Plná agregace destiček vyžaduje jejich současnou aktivaci. **(**Gremmel et al. 2016) Receptor $P2Y_1$ je zodpovědný za změnu tvaru destiček a iniciuje ADP-indukovanou agregaci, která je malá a reverzibilní. (Ribes et al. 2023) Tento receptor je spřažen s Gq proteinem a po jeho aktivaci dochází ke stimulaci fosfolipázy C, která hydrolyzuje fosfatidylinositol–4,5–bisfosfát (PIP_2) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). (Liu a Wu 2004) IP_3 způsobuje uvolnění vápenatých iontů z intracelulárních zásob, zatímco DAG aktivuje proteinkinázu C, která podporuje agregaci krevních destiček. (Nagy et al. 2009) Stimulací receptoru $P2Y_{12}$, spřaženého s Gi proteinem, dochází k inhibici adenylátcyklázy, což snižuje hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). (Li a Anand-Srivastava 2023)

Receptory pro trombin

Trombin je nejúčinnější známý agonista, který působí prostřednictvím specifických receptorů PAR (*protease-activated receptors*), což je skupina G-protein spřažených receptorů aktivovaných proteolytickým štěpením. Na lidských trombocytech jsou přítomny zejména PAR1 a PAR4, které zprostředkovávají většinu účinků trombinu. Tyto receptory nesou na svém povrchu vlastní ligand, který zůstává neaktivní, dokud není receptor štěpen proteázou. (Coughlin 2005; Woulfe 2005) Po navázání trombinu dochází ke štěpení N-konce receptoru, čímž vzniká nový N-konec, který se stává intramolekulárním ligandem. Tento ligand se váže na vlastní receptor, vyvolává konformační změnu a iniciuje aktivaci Gq proteinu. (Hashemzadeh et al. 2023; Woulfe 2005) Krevní destičky stimulované trombinem vykazují rychlý vzestup intracelulárního vápníku a současně pokles intracelulární koncentrace cAMP. (Woulfe 2005)

Receptory pro tromboxan

Tromboxan A_2 je hlavním ligandem tromboxanových receptorů. Jedná se o vazokonstrikční a proagregační činidlo, které patří do rodiny eikosanoidů vzniklých metabolismem AA. (Hashemzadeh et al. 2023; Reilly a Fitzgerald 1993) Kyselina arachidonová vzniká z membránových fosfolipidů, konkrétně z fosfatidylcholinu, působením fosfolipázy A_2. (Duttaroy 2018) Po uvolnění AA do cytosolu dochází k její přeměně cyklooxygenázou 1 (COX-1) na prostaglandiny G_2 a H_2 (PGG_2 a PGH_2). PGH_2 je následně přeměněn na TXA_2 pomocí tromboxansyntázy. (Capra et al. 2014) Receptor TXA_2 je spřažen s Gq proteinem. (Woulfe 2005)

Glykoproteinové receptory

Na povrchu krevních destiček se nachází mnoho typů glykoproteinových receptorů, přičemž mezi nejvýznamnější patří GP VI, komplex GP Ib-IX-V a GP IIb/IIIa. (Gremmel et al. 2016)

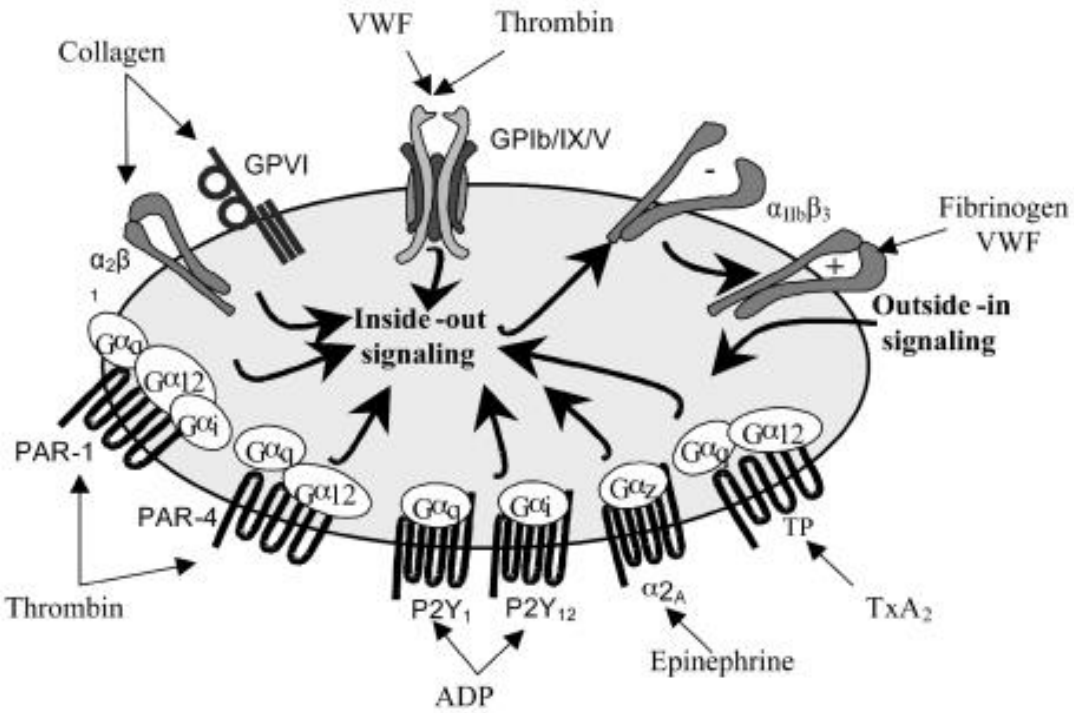
Glykoprotein VI je membránový imunoglobulinový receptor destiček, sloužící jako hlavní receptor pro kolagen. Kolagen, jakožto jedna z hlavních složek cévní stěny, je zodpovědný za adhezi a aktivaci trombocytů v místech cévního poranění. (Nieswandt et al. 2000) Po poškození cévy se kolagen dostává do kontaktu s cirkulujícími destičkami. (Roberts et al. 2004) Interakce mezi kolagenem a trombocyty může nastat nepřímo prostřednictvím intermediárních proteinů, jako je vWF, nebo přímým rozpoznáním kolagenu specifickými receptory. Přímé interakce zprostředkovává GP Ia/IIa, který je zodpovědný za přilnutí destičky ke kolagenu, a GP VI, který hraje zásadní roli při aktivaci trombocytů. (Nieswandt et al. 2000)

Komplex GP Ib-IX-V se skládá ze čtyř glykoproteinových podjednotek – GP Ibα, GP Ibβ, GP IX a GP V. Představuje receptor schopný interagovat s řadou ligandů včetně adhezivního vWF, koagulačních faktorů XI a XII, trombinu a membránového glykoproteinu P-selektinu. (Canobbio et al. 2004) Tento komplex zprostředkovává adhezi trombocytů k endoteliálním buňkám a subendotelialním strukturám poraněné cévní stěny, především prostřednictvím vWF. (Gremmel et al. 2016)

Von Willebrandův faktor je z α-granulí uvolňován vlivem agonistů a váže se na receptor GP IIb/IIIa, čímž vytváří most mezi destičkou a subendotelialním povrchem poškozené cévní stěny. Tento mechanismus iniciuje a podporuje šíření krevních destiček. vWF rovněž působí jako mezibuněčný můstek mezi jednotlivými trombocyty a přispívá k jejich agregaci. (Gralnick et al. 1991)

Receptor αIIbβ3, známý také jako integrin nebo glykoprotein IIb/IIIa, je Ca^{2+}-dependentní heterodimer složený ze dvou podjednotek spojených nekovalentními interakcemi. (Hashemzadeh et al. 2023; Phillips et al. 1988**)** V klidovém stavu vykazuje receptor nízkou afinitu k ligandům, což je dáno špatnou dostupností vazebného místa. Po stimulaci agonisty dochází ke konformační změně receptoru a přechodu do stavu s vysokou afinitou k fibrinogenu a vWF. (Hashemzadeh et al. 2023)

Na povrchu trombocytů byly dále identifikovány serotoninové receptory, přičemž hlavní z nich je 5–HT_2A receptor, který aktivuje signální dráhu závislou na vápníku. Serotonin je uvolňován z denzních granulí aktivovaných destiček a zesiluje agregaci vyvolanou jinými agonisty, sám o sobě však agregaci nevyvolává. (Saboor et al. 2013) Dále jsou přítomny receptory s tyrosinkinázovou aktivitou, které slouží jako receptory pro cytokiny, růstové faktory, hormony a další signální molekuly. Patří mezi ně například inzulinové receptory, jejichž aktivace reguluje funkci destiček a má antiagregační účinek. (Kakouros et al. 2011; Saboor et al. 2013)



Obrázek 3. Vybrané receptory na membráně krevní destičky (Rivera et al. 2009)

3.1.5 Hemostáza

Hemostáza, tedy zástava krvácení, probíhá ve čtyřech krocích – vazokonstrikce, primární hemostáza, sekundární hemostáza (koagulace) a fibrinolýza.

Po poranění cévy okamžitě nastupuje vazokonstrikce, která omezuje ztrátu krve a zpomaluje průtok v postiženém místě, čímž umožňuje adhezi krevních destiček k subendotelu. (Hashemzadeh et al. 2023)

Primární hemostáza zahrnuje tvorbu destičkové zátky v místě poranění. Za fyziologických podmínek endotel brání adhezi trombocytů, avšak po poranění cévní stěny dochází k vystavení subendoteliálního kolagenu. (Neubauer a Zieger 2022; Twomey et al. 2018) Adheze je zprostředkována interakcí mezi cirkulujícími trombocyty, subendotelialním kolagenem a vWF. Nejprve dochází k navázání cirkulujícího vWF na kolagen v místě poranění, následně imobilizovaný vWF interaguje s receptorem GP Ib-IX-V na povrchu destiček. (Fountain a Lappin 2025; Sangkuhl et al. 2011) Tato vazba je klíčová zejména při vysokých smykových rychlostech, protože zpomaluje destičky a udržuje je v těsném kontaktu s endotelem. Při nižších průtocích mohou destičky vázat kolagen přímo prostřednictvím specifických receptorů. (Ruggeri a Mendolicchio 2007; Twomey et al. 2018)

Aktivace destiček je podmíněna vzestupem intracelulární koncentrace vápníku (Ca^{2+}). Tento vzestup je zprostředkován uvolněním Ca^{2+} z intracelulárních zásob v hustém tubulárním systému (DTS) a vstupem iontů z extracelulárního prostoru prostřednictvím iontových kanálků. (Gresele et al. 2017; Sangkuhl et al. 2011) Již mírné zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu vede ke změně tvaru destičky z diskovitého na kulovitý, zatímco agregace a sekrece granulí nastává až při vyšších hladinách Ca^{2+}. (Blockmans et al. 1995)

K hlavním enzymům podílejících se na zvýšení cytosolické koncentrace vápníku za účasti druhých poslů patří fosfolipáza C a fosfolipáza A_2. Fosfolipáza C působí prostřednictvím IP_3, který aktivuje vápenaté kanálky v DTS a mobilizuje Ca^{2+} do cytoplazmy. (Rao 1993) Aktivaci fosfolipázy C vyvolávají agonisté jako ADP, destičkový aktivační faktor (PAF), trombin, nebo TXA_2. (Gresele et al. 2017) Zvýšení hladiny Ca^{2+} zároveň stimuluje fosfolipázu A_2, která uvolňuje AA z membránových fosfolipidů a slouží jako substrát pro syntézu tromboxanu A_2, jenž podporuje celkovou aktivaci trombocytů. (Rao 1993)

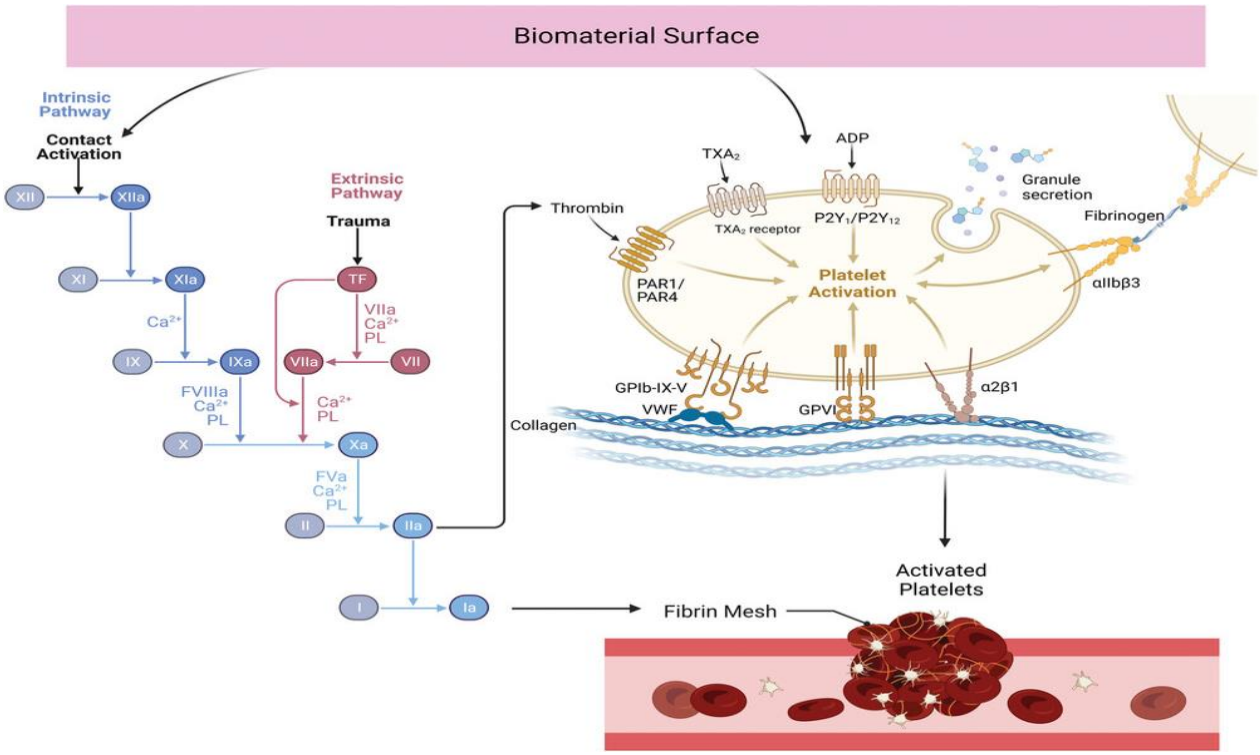
K regulaci aktivace krevních destiček za fyziologických podmínek slouží inhibiční mechanismy, které omezují nežádoucí aktivaci mimo místo poranění. Této regulace je dosaženo především vlivem endoteliálních faktorů PGI_2 a oxidu dusnatého (NO), které aktivují signální dráhy závislé na cAMP a cGMP. (Kleppe et al. 2018; Sang et al. 2021) Prostacyklin,

syntetizovaný z AA, rozšiřuje cévy, inhibuje agregaci krevních destiček a rozptyluje již vzniklé agregáty. (Reilly a Fitzgerald 1993) Jeho receptor je spřažen s Gs proteinem, což vede ke zvýšení intracelulární hladiny cAMP. Vysoké koncentrace cAMP snižují uvolňování Ca^{2+} do cytosolu a potlačují tak aktivaci trombocytů a udržují je v klidovém stavu. (Woulfe 2005) NO aktivuje guanylátcyklázu, zvyšuje hladinu cGMP a tím snižuje koncentraci volného vápníku. (Sang et al. 2021)

Závěrečným krokem primární hemostázy je agregace trombocytů, zprostředkovaná interakcí integrinu $\alpha IIb\beta_3$ s fibrinogenem. (Twomey et al. 2018) Aktivace integrinu vede ke změně jeho konformace, což umožňuje fibrinogenu vázat se na receptory dvou sousedních destiček a vyvářet tak agregáty. (Twomey et al. 2018; Weisel 2005) Vzniká primární destičková zátka, která dočasně snižuje, nebo zcela zastavuje krvácení. (Davie et al. 1991; Švihovec 2018) Současně dochází na povrchu aktivovaných destiček k expozici negativně nabitých fosfolipidů, které slouží jako platforma pro sestavení prokoagulačních proteinů a aktivaci koagulační kaskády. (Chapin a Hajjar 2015)

Sekundární hemostáza (koagulace) zahrnuje tvorbu nerozpustného fibrinu pomocí enzymatických reakcí zprostředkovaných serinovými proteázami. Trombin, vznikající aktivací protrombinu, štěpí rozpustný fibrinogen na fibrin, který následně polymerizuje a vytváří stabilní síť. Tato síť je dále zesíťována pomocí faktoru XIIIa, aktivovaného trombinem, čímž vzniká pevná struktura trombu. (Chapin a Hajjar 2015)

Po zhojení poraněné cévy dochází k fibrinolýze, tedy rozkladu vzniklého trombu plazminem. Plazmin vzniká aktivací plazminogenu působením tkáňového (tPA) nebo urokinázového aktivátoru plazminogenu (uPA), a následně štěpí fibrinovou síť. Zatímco tPA je syntetizován a uvolňován endotelovými buňkami, uPA je produkován monocyty, makrofágy a epitelem močových cest. (Chapin a Hajjar 2015) Mezi procesy koagulace a fibrinolýzy je dynamická rovnováha, neboť jak tvorba fibrinu, tak rozklad trombu musí být pečlivě regulovány. Nerovnováha může vést buď ke ztrátě krve v důsledku krvácení, nebo k zablokování průtoku krve v důsledku trombózy. (Weisel 2005)



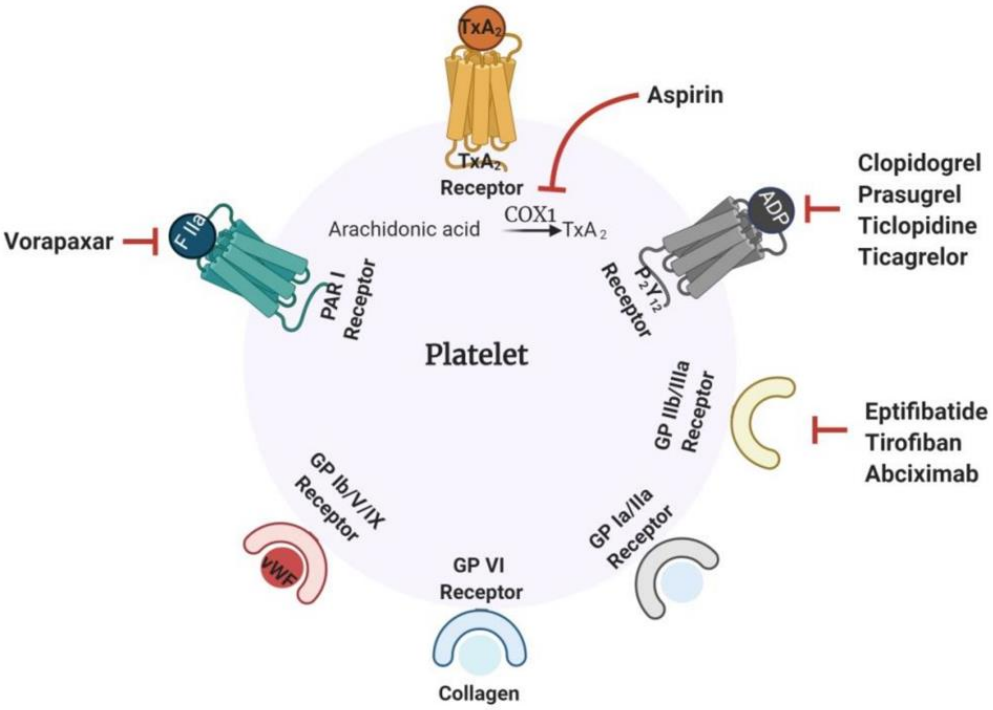
Obrázek 4. Souhra mezi aktivací krevních destiček (vpravo) a koagulační kaskádou (vlevo).

(Zeibi Shirejini et al. 2023)

3.2 Protidestičková léčiva

Protidestičková léčba představuje základní pilíř terapie pacientů s vysokým rizikem kardiovaskulárních příhod. (Kvasnička 2024) Základním cílem léčby je primární či sekundární prevence aterotrombózy, která je příčinou závažných onemocnění, jako jsou akutní koronární syndrom (AKS), ischemická cévní mozková příhoda (iCMP) a symptomatický uzávěr periferního arteriálního řečiště. Tyto stavy patří mezi nejčastější příčiny morbidity i mortality ve vyspělých zemích. (Poul 2012)

Protidestičková léčiva (viz obr. 5) se dělí na perorální a parenterální formy. Perorální léčiva se dále rozlišují na základě jejich mechanismu účinku. Mezi nejčastěji používané patří aspirin, klopidogrel, tikagrelor, prasugrel a vorapaxar. Intravenózní podání je dostupné pro kangrelor a inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa, jako jsou abciximab a eptifibatid. Tato léčiva se užívají především krátkodobě, zejména v rámci akutních koronárních syndromů a v průběhu perkutánní koronární intervence (PCI). (Iqbal et al. 2025)



Obrázek 5. Hlavní cílová místa protidestičkových léčiv (Dwivedi a Pomin 2020)

3.2.1 Inhibitory cyklooxygenázy

Kyselina acetylsalicylová (ASA) je nejstarším a stále nejpoužívanějším protidestičkovým léčivem. V nízké dávce se užívá jako antitrombotikum, ve vyšších dávkách jako analgetikum a antiflogistikum. (Švihovec 2018)

Mechanismus antiagregačního účinku byl objeven v roce 1971, přestože ASA byla komerčně dostupná již od roku 1899 pro své protizánětlivé a analgetické účinky. (Brener 2021) Hlavním mechanismem účinku je trvalá inaktivace destičkové COX-1 nízkou dávkou ASA, která způsobí inhibici syntézy tromboxanu A_2. (Gresele et al. 2017) K tomu dochází acetylací serinového zbytku v aktivním místě cyklooxygenázy, což vede ke sterickému bránění enzymu. (DeLoughery 2019) Díky kovalentní vazbě mezi ASA a serinem dochází k ireverzibilní inaktivaci enzymu. Ve vyšších dávkách ASA navíc snižuje tvorbu prozánětlivých prostaglandinů, zejména PGE_2 a prostacyklinu PGI_2. (Švihovec 2018)

ASA se rychle absorbuje pasivní difuzí, především v žaludku a horní části tenkého střeva. (Gresele et al. 2017) U většiny pacientů může být trombocytární COX inhibována denní dávkou 30 mg, ze studií však vyplývá, že dostatečnou klinickou účinnost vykazují dávky od 80 mg/den. (Poul 2012) Ačkoliv je biologický poločas ASA přibližně 20 minut, její účinek na krevní destičky přetrvává po celou dobu jejich životnosti. (Gresele et al. 2017) Trombocyt, jako bezjaderná buňka, totiž není schopen syntetizovat novou COX-1. (Švihovec 2018)

Dominantním nežádoucím účinkem je zvýšené riziko krvácení, které je obdobné i u ostatních protidestičkových léčiv. Riziko zvyšují faktory jako vyšší věk, hypertenze, renální selhání či současné užívání nesteroidních antiflogistik (NSAID), která blokují aktivní místo enzymu. Mezi další NÚ patří nauzeu, zvracení, vznik duodenálních a žaludečních vředů, alergické reakce a vzácně i aspirinové astma. (Švihovec 2018) Často je pozorována tzv. aspirinová rezistence, při níž je snížená odpověď na ASA, což vede k vyššímu riziku opakovaných kardiovaskulárních příhod. (Zhou et al. 2020)

3.2.2 Inhibitory receptoru $P2Y_{12}$

Společným mechanismem této skupiny léčiv je blokáda ADP receptoru $P2Y_{12}$. Klopidogrel, prasugrel a tiklopidin inhibují receptor ireverzibilně. Nový receptor nemůže být syntetizován a aktivace destičky touto cestou je tak trvale zablokována. Tikagrelor a kangrelor působí jako reverzibilní inhibitory prostřednictvím kompetitivní inhibice a účinek je zajištěn jen po dobu dostatečné plazmatické koncentrace. (Švihovec 2018)

Mohou být součástí duální protidestičkové léčby v kombinaci s ASA, zejména v prevenci aterotrombotických příhod po PCI, nebo při koronárním syndromu. Nevýhodou je zvýšené riziko krvácení v porovnání s monoterapii. (Sinnaeve a Adriaenssens 2021)

Klopidogrel je nejčastěji užívaným inhibitorem destičkového receptoru $P2Y_{12}$. (DeLoughery 2019) Jde o proléčivo, které vyžaduje metabolickou aktivaci. (Brener 2021) Jeho absorpce je ovlivněna aktivitou P-glykoproteinu, což vede k variabilní biologické dostupnosti (40-80 %). (Švihovec 2018) Po absorpci je přibližně 85 % dávky v krvi hydrolyzováno esterázami na neaktivní metabolity, zatímco zbývajících 15 % absorbovaného léčiva je přeměněno dvoustupňovým oxidačním metabolismem za účasti jaterních cytochromů P450 (zejména CYP2C19) na aktivní formu. (Gresele et al. 2017; Švihovec 2018)

CYP2C19 je polymorfní enzym – až u 30 % populace vykazuje sníženou aktivitu, což oslabuje antitrombotický účinek klopidogrelu. (Gresele et al. 2017) Významnou roli hrají také lékové interakce, zejména kompetitivní inhibice způsobená inhibitory protonové pumpy, jako je omeprazol. V případě inhibice CYP2C19, nebo jeho nízké aktivity, může dojít k selhání bioaktivace klopidogrelu. (Švihovec 2018) Mezi další faktory ovlivňující účinnost patří také diabetes mellitus. U diabetiků je změněn farmakokinetický profil klopidogrelu, což může vést k méně účinné inhibici aktivace krevních destiček. (Gresele et al. 2017)

Obvyklá dávka je 75 mg jednou denně a antiagregační účinek může přetrvávat až 7 dní po ukončení léčby. (DeLoughery 2019) Mezi nežádoucí účinky patří kromě krvácení také častější výskyt dušnosti. (Švihovec 2018)

Prasugrel je rovněž proléčivo, které vyžaduje pouze jednostupňovou oxidaci zprostředkovanou zejména jaterními enzymy CYP3A4 a CYP2B6. (Brener 2021) Přibližně 80 % dávky je konvertováno na účinný metabolit. (Švihovec 2018) Ačkoli aktivní metabolity prasugrelu a klopidogrelu vykazují stejnou účinnost, prasugrel má rychlejší nastup účinku díky méně problematické bioaktivaci a absorpci, dále má silnější inhibici a nižší interindividuální variabilitu odpovědi. (Brener 2021)

Počáteční nasycovací dávka při AKS činí 60 mg a následná udržovací dávka je 10 mg denně. U pacientů s tělesnou hmotností nižší než 60 kg, nebo věkem vyšším než 75 let je vyšší riziko krvácení, proto se doporučuje opatrnost. Podávání prasugrelu by mělo být vždy kombinováno s ASA. (Sampat a Wadhwa 2025)

Tikagrelor má reverzibilní účinek, což je výhodné například při akutních chirurgických zákrocích, nebo v případě poranění. U tikagreloru není nutná metabolická aktivace, neboť inhibiční účinek zajišťuje přímo mateřská látka. (Švihovec 2018) V porovnání s klopidogrelem má rychlejší nástup účinku a silnější protidestičkový efekt. Nasycovací dávka je 180 mg, poté 90 mg dvakrát denně jako dávka udržovací. (Brener 2021)

Tikagrelor je metabolizován CYP3A4 a jeho plazmatická koncentrace může být ovlivněna farmakokinetickými interakcemi. Současné podávání induktorů CYP3A4 snižuje jeho účinnost a zvyšuje riziko trombotických příhod, zatímco inhibitory tohoto enzymu mohou vést ke zvýšení jeho plazmatické koncentrace, a tím i k vyššímu riziku krvácení. Z hlediska bezpečnosti je léčba tikagrelorem spojena nejen s vyšším rizikem krvácení, ale také s výskytem nehemorhagických NÚ, zejména dušnosti, komorových pauz a zvýšených hladin kreatininu a kyseliny močové. (Brener 2021)

Kangrelor je prvním a jediným intravenózním inhibitorem receptoru $P2Y_{12}$. Hlavní výhodou je velmi silná a rychlá inhibice krevních destiček a dosažení ustáleného stavu během několika minut po podaní. (Gresele et al. 2017)

3.2.3 Inhibitory glykoproteinového receptoru GP IIb/IIIa

Inhibitory GP IIb/IIIa jsou intravenózně podávané antiagregační látky s rychlým nástupem účinku. Používají se k dosažení maximální antiagregační aktivity u pacientů s AKS a u pacientů podstupujících PCI. (Gresele et al. 2017) Jelikož je glykoproteinový komplex konečnou cestou agregace trombocytů, mají tyto inhibitory silné antiagregační účinky. Mezi tuto skupinu léčiv patří syntetické či malé molekuly (eptifibatid, tirofiban) a dále protilátky, z nichž jediným zástupcem je již nepoužívaný abciximab. (Brener 2021; Stanger et al. 2023)

Abciximab byl prvním inhibitorem glykoproteinového komplexu IIb/IIIa, který získal schválení FDA pro klinické použití v roce 1997. (Gresele et al. 2017) Původně šlo o myší monoklonální protilátku proti tomuto receptoru. Za účelem snížení imunogenicity byl odstraněn Fc fragment a vytvořen chimérický fragment protilátky, známý jako abciximab. Jedná se o velkou molekulu s vysokou afinitou k receptoru GP IIb/IIIa, která se na něj váže ireverzibilně. (Brener 2021) Výroba abciximabu byla ukončena v roce 2020. (Stanger et al. 2023)

Eptifibatid je syntetický cyklický heptapeptid odvozený z proteinu přítomného v jedu chřestýše. (Brener 2021) Vývoj peptidových léčiv v posledních letech zaznamenal značný pokrok, zejména díky novým technologiím, které podnítily intenzivní výzkum v této oblasti. Peptidová léčiva se ukazují jako slibná zejména v terapii kardiovaskulárních onemocnění, jako je AKS. (Tonin a Klen 2023) Jedním z těchto perspektivních léčiv je právě eptifibatid, který je vysoce specifický pro receptor GP IIb/IIIa. (Brener 2021)

Na rozdíl od abciximabu je účinek na destičky reverzibilní, což je dáno nižší afinitou k receptoru. Eptifibatid má krátký eliminační poločas v krevním řečišti, což je výsledkem jeho rychlého štěpení proteázami a peptidázami. (Brener 2021; Tonin a Klen 2023) Standardně se používá v akutních fázích AKS, avšak stále častěji nachází uplatnění i v nových indikacích, jako je léčba iCMP, stentování intrakraniálních aneurysmat a karotických tepen či v kontextu septického šoku. (Tonin a Klen 2023)

Tirofiban je nepeptidový derivát tyrosinu, který se váže na glykoproteinový receptor. Jeho poločas rozpadu je velmi krátký. (Gresele et al. 2017)

3.2.4 Inhibitory fosfodiesterázy

Fosfodiesterázy (PDE) hydrolyzují klíčové inhibiční intracelulární sekundární posly cAMP a cGMP na inaktivní AMP a GMP. Zvýšené hladiny sekundárních poslů jsou spojeny s oslabenou agregací destiček. Inhibice PDE omezuje hydrolýzu cyklických nukleotidů a zvyšuje jejich hladiny, což usnadňuje inhibici destiček. (Brener 2021) V současnosti nejsou k dispozici žádné registrované inhibitory PDE určené pro klinické použití. (Stanger et al. 2023)

Cilostazol je derivát 2-oxochinolinu, který selektivně inhibuje PDE3. (Brener 2021) Byl schválen FDA v roce 1999 pro léčbu pacientů s periferním cévním onemocněním. Klinické studie zkoumaly jeho účinek v kombinaci s ASA nebo inhibitorem receptoru $P2Y_{12}$ v rámci sekundární prevence trombózy. Některé z těchto studií prokázaly, že léčba je přínosná pro sekundární prevenci u pacientů s CMP. Není však zcela jisté, zda má přínos i u pacientů s iCMP spojenou s onemocněním malých cév. Cilostazol byl klinicky používán v kombinaci s ASA, nicméně jeho výroba byla ukončena v roce 2015. (Stanger et al. 2023)

3.2.5 Inhibitory trombinových receptorů

Vorapaxar je perorálně aktivní, vysoce selektivní a kompetitivní antagonista trombinového receptoru PAR1. (Brener 2021) Jedná se o syntetický derivát himbacinu, přírodního alkaloidu nalezeného v kůře australských magnolií. Mechanismus účinku spočívá v inhibici trombinem indukované aktivace destiček, přičemž významně neovlivňuje agregaci destiček vyvolanou ADP. Zároveň nezasahuje do dalších funkcí trombinu, jako je štěpení fibrinogenu, nebo tvorba fibrinu. (Gresele et al. 2017) Díky selektivitě k PAR1 neovlivňuje koagulaci, ani dobu srážení destiček. (Brener 2021)

Vorapaxar je schválen k redukci rizika trombotických kardiovaskulárních příhod u pacientů s anamnézou infarktu myokardu nebo onemocněním periferních tepen. (Poole a Elkinson 2014) Podává se v dávce 40 mg. Po podaní je rychle absorbován a dosahuje biologické dostupnosti vyšší než 90 %. Ačkoli se jedná o reverzibilního antagonistu, jeho dlouhý eliminační poločas způsobuje funkčně ireverzibilní účinek, což umožňuje konzistentní inhibici trombocytární aktivity. (Brener 2021)

Jednorázová dávka 40 mg zcela inhibuje agregaci krevních destiček během jedné hodiny, přičemž tento účinek přetrvává po dobu přibližně tří dnů. Úplná a stabilní inhibice je udržována při dávkování 2,5 mg jednou denně. (Brener 2021)

3.3 Diabetes mellitus II. typu

Diabetes mellitus (DM) představuje soubor autoimunitních, metabolických a genetických poruch charakterizovaných chronickou hyperglykémií. (Egan a Dinneen 2019) Diagnózu DM lze stanovit při hodnotě glukózy ve venózní plazmě vyšší než 7 mmol/l po alespoň osmihodinovém lačnění. (Státní zdravotní ústav 2025) Dále se může k diagnostice využít orální glukózový toleranční test (OGTT), kdy je hladina plazmatické glukózy 2 hodiny po požití sladkého nápoje vyšší než 11,1 mmol/l, nebo když náhodná hladina plazmatická glukózy přesahuje 11,1 mmol/l. (Státní zdravotní ústav 2025; Antar et al. 2023)

3.3.1 Epidemiologie

Diabetes mellitus II. typu představuje významný zdravotnický problém v České republice s rostoucí prevalencí a incidencí v posledních desetiletích. Podle údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) bylo k 31. prosinci 2023 v České republice registrováno přibližně 10% populace s diagnózou DM. (Národní zdravotnický informační portál 2025)

Prevalence diabetu dosáhla v roce 2023 v České republice hodnoty více než 1 113 000 pacientů. Výskyt diabetu výrazně stoupá s věkem, přičemž nejvyšší prevalence byla zaznamenána ve věkové skupině 70-74 let. Mírně vyšší zastoupení pacientů je mezi muži, kteří tvoří 50,6 % všech případů. (Národní zdravotnický informační portál 2025)

Incidence diabetu činila v roce 2023 přibližně 123 750 nově diagnostikovaných osob, přičemž naprostá většina nových diagnóz připadá na T2DM. Nejvyšší incidence byla zaznamenána ve věkové skupině 65-69 let. Z hlediska pohlaví bylo procentuální zastoupení mírně vyšší u žen, které tvořily 51,2 % případů. (Národní zdravotnický informační portál 2025)

Diabetes představuje jednu z nejrychleji rostoucích globálních zdravotních hrozeb. Podle Mezinárodní federace pro diabetes (IDF) žilo v roce 2024 přibližně 589 milionů dospělých ve věku 20-79 let s diabetem, což odpovídá 11,1 % této věkové skupiny – tedy přibližně 1 z 9 dospělých. Předpokládá se, že do roku 2050 vzroste prevalence na 853 milionů lidí, což představuje nárůst o 46 %. Mezi hlavní příčiny nárůstu diabetu II. typu patří stárnutí populace, snižující se úroveň fyzické aktivity a rostoucí prevalence nadváhy a obezity. (International Diabetes Federation 2025)

3.3.2 Patofyziologie

Diabetes mellitus II. typu (T2DM) je nejrozšířenější formou tohoto onemocnění – více než 95 % pacientů s diabetem má právě tento typ. (World Health Organization 2025) Je charakterizován kombinací inzulinové rezistence (IR) v periferních tkáních a relativního nedostatku inzulinu. Inzulinová rezistence znamená sníženou citlivost buněk na účinky inzulinu. Výsledkem je omezené využití glukózy v periferních tkáních po jídle a současně zvýšená produkce glukózy v játrech, což vede k hyperglykémii jak postprandiální, tak i nalačno. (Fialová a Vlček 2009) Na rozdíl od pacientů s DM I. typu si jedinci s T2DM dokážou inzulin produkovat (Cowap 2015), avšak jeho sekrece z β-buněk pankreatu je nedostatečná, nebo cílové tkáně citlivé na inzulin nejsou schopné na něj adekvátně reagovat. (Galicia-Garcia 2020) Poměr těchto dvou mechanismů se u jednotlivých pacientů liší, což ovlivňuje jak klinický průběh onemocnění, tak i volbu terapeutického přístupu.

Vznik T2DM je často podmíněn geneticky, avšak genetické predispozice představují pouze základní předpoklad pro rozvoj onemocnění. Mezi klíčové rizikové faktory patří obezita a nedostatek fyzické aktivity. (World Health Organization 2025) Jedná se zejména o zvýšení tukové tkáně v oblasti břicha, která výrazně přispívá k rozvoji IR. Svou roli hrají také nevhodné stravovací návyky a věk, neboť riziko vzniku T2DM roste se zvyšujícím se věkem, a to zejména po 45. roce života. (Státní zdravotní ústav 2025) Vzhledem k narůstajícímu výskytu obezity u mladší populace se však T2DM stále častěji vyskytuje i u dospívajících jedinců. (Lascar et al.2018; Státní zdravotní ústav 2025)

3.3.3 Komplikace diabetu

Komplikace diabetu se dělí na akutní a chronické. Mezi hlavní akutní komplikace patří hypoglykémie, diabetická ketoacidóza a hyperosmolární hyperglykemický stav bez ketoacidózy. Hypoglykémie označuje plazmatickou hladinu glukózy pod hodnotu 3,3 mmol/l a postihuje hlavně pacienty léčené inzulinem, nebo deriváty sulfonylurey. (Piťhová 2006) Může být vyvolána fyzickou námahou, nedostatečným příjmem sacharidů, nadměrnou konzumací alkoholu, nebo zhoršenou funkcí ledvin. Projevuje se třesem, pocením, zimnicí, rozmazaným viděním, zmateností až poruchou vědomí. (Cowap 2015; Rybka 2007)

Diabetická ketoacidóza je reverzibilní komplikace charakterizována těžkými poruchami regulace sacharidového, tukového a proteinového metabolismu. (Rybka 2007) Deficit inzulinu zvyšuje lipolýzu a hladinu sérových volných mastných kyselin. Játra na to reagují zvýšením oxidace mastných kyselin, což má za následek nadprodukci kyselých ketolátek, které se

hromadí v krvi a způsobují acidózu a zrychlenou respiraci. (Piťhová 2006; Rybka 2007) Typicky postihuje pacienty s diabetem I. typu. (Piťhová 2006)

Hyperosmolární hyperglykemický stav bez ketoacidózy je typický pro diabetiky II. typu, u nichž je zachovaná bazální sekrece inzulinu, která ketogenezi inhibuje. (Fialová a Vlček 2009) Tento stav se se vyznačuje extrémní hyperglykémií (často vyšší než 35-50 mmol/l), těžkou dehydratací a poruchami vědomí. (Piťhová 2006)

Dlouhodobě špatně kompenzovaný DM může vést k řadě chronickým komplikacím. Tyto komplikace zahrnují mikroangiopatie (nefropatie, retinopatie, neuropatie) vznikající poškozením malých cév a makroangiopatie postihující střední a velké tepny. (Perušičová a Šmahelová 2001) Nefropatie vzniká poškozením glomerulů a projevuje se narůstajícím únikem proteinů do moči, a v pokročilém stádiu vede k selhání ledvin. Retinopatie postihuje cévy sítnice s rizikem krvácení a následné slepoty. Neuropatie se vyskytuje u více než poloviny pacientů s diabetem. Rozlišujeme diabetickou periferní neuropatii a autonomní neuropatii podle toho, které nervy jsou postiženy. (Škrha 2007) Periferní neuropatie nejčastěji postihuje oboustranně dlouhé nervy dolních končetin a vede k poruchám citlivosti i hybnosti. (Saudek 2020) Projevuje se řezavými či palčivými bolestmi, brněním, pálením nebo sníženým vnímáním dotyku a bolesti, což zvyšuje riziko poranění. (Saudek 2020; Rybka 2007) Autonomní neuropatie postihuje autonomní nervová vlákna a může se projevovat poruchami regulace krevního tlaku, zpomaleným vyprazdňováním žaludku, poruchami střevní pasáže, močovou retencí a sexuální dysfunkcí u mužů. (Škrha 2007) Závažnou kombinovanou komplikací je diabetická noha, která vzniká v důsledku poruchy citlivosti a prokrvení, a může vést až k amputaci. Chronické makroangiopatické komplikace se u T2DM vyskytují častěji než mikroangiopatické. (Fialová a Vlček 2009) Zvyšují riziko aterosklerózy a s ní spojených komplikací, jako je infarkt myokardu, CMP nebo ischemická choroba dolních končetin (ICHDK). (Fialová a Vlček 2009; Škrha 2007)

3.3.4 Farmakoterapie diabetu II. typu

Léčba T2DM je komplexní a zahrnuje kombinaci úpravy životního stylu a farmakoterapie. (Státní zdravotní ústav 2025) Nefarmakologická léčba spočívá především v individuálně nastaveném dietním režimu a pravidelné fyzické aktivitě. Energetický příjem stravy je stanoven na základě tělesné hmotnosti, věku a celkového denního režimu pacienta. Lékař rozhoduje, zda je dostačující diabetická dieta s omezeným příjmem sacharidů, nebo je vzhledem k nadváze či obezitě nutná dieta redukční. (Česká diabetologická společnost 2020)

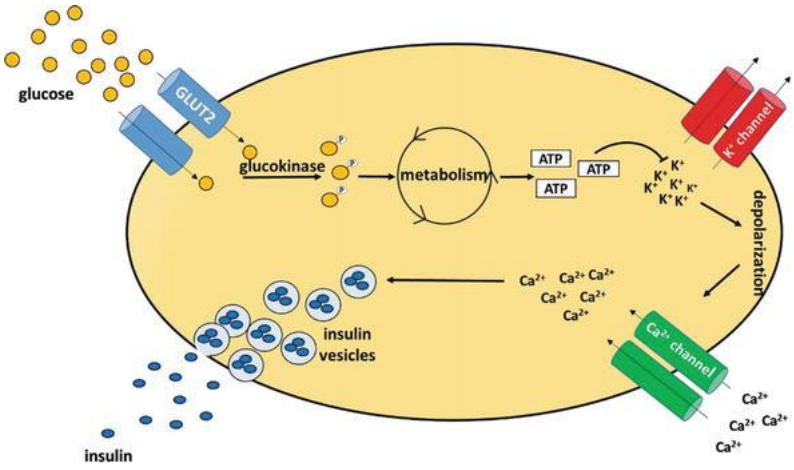
Při redukci hmotnosti je nevhodné přijímat jednoduché sacharidy, naopak se doporučují potraviny bohaté na vlákninu s nízkým glykemickým indexem. (Česká diabetologická společnost 2012) Strava s vysokým obsahem tuků není rovněž vhodná, neboť kromě zvýšení tělesné hmotnosti přispívá také ke zhoršení IR. (Lovejoy 2002) Nedílnou součástí léčby je pravidelná fyzická aktivita, která přispívá k redukci hmotnosti i ke zlepšení inzulinové senzitivity. (Státní zdravotní ústav 2025) U části pacientů může komplexní úprava životního stylu vést až k remisi onemocnění. (Ried-Larsen et al. 2019)

Farmakologická léčba zpravidla začíná podáním metforminu, a to pro jeho osvědčenou účinnost, dobrou snášenlivost a příznivou cenu. (DeMarsilis et al. 2022) V případě nedostatečné kompenzace se do kombinace přidávají další perorální antidiabetika (PAD), například deriváty sulfonylurey (DSU), glinidy, glitazony, inkretinová léčiva nebo inhibitory SGLT2. (Fialová a Vlček 2009)

Metformin inhibuje jaterní glukoneogenezi, zvyšuje endogenní hladiny GLP-1, obnovuje sekreci inzulinu a chrání buňky slinivky břišní před lipotoxicitou a glukotoxicitou. (DeMarsilis et al. 2022) Hlavním mechanismem účinku je však zvýšení citlivosti tkání na inzulin, díky čemuž je metformin označován jako inzulinový senzitizér. Má příznivý vliv na tělesnou hmotnost a nezvyšuje riziko hypoglykémie. (Fialová a Vlček 2009) Nejčastějšími NÚ jsou gastrointestinální potíže, jejichž výskyt závisí na dávce. Nejzávažnějším NÚ je laktátová acidóza, kde riziko stoupá při renálním poškození, vyšším věku (nad 65 let), hypoxických stavech, nadměrné konzumaci alkoholu a při jaterní insuficienci. (DeMarsilis et al. 2022)

Deriváty sulfonylurey (DSU) jsou inzulinová sekretagoga, která se vážou na specifické receptory na povrchu β-buněk pankreatu. (DeMarsilis et al. 2022) Dochází k uzavření ATP-senzitivních draslíkových kanálů, depolarizaci buněčné membrány a otevření kalciových kanálů. Zvýšený vstup Ca^{2+} do buňky spouští exocytózu inzulinu do krevního oběhu. (Fialová a Vlček 2009) DSU stimulují sekreci inzulinu nezávisle na glykémii, proto hrozí riziko hypoglykémie a nárůst tělesné hmotnosti. (DeMarsilis et al. 2022) V klinické praxi se používají glibenklamid, gliklazid, gliquidon a glimepirid. DSU jsou kontraindikovány při těžkém jaterním a renálním selhání, v těhotenství a u pacientů s diabetem I. typu. (Fialová a Vlček 2009)

Glinidy představují další skupinu inzulinových sekretagog, která obdobně jako DSU stimulují uvolňování inzulinu (obr.6), avšak vážou se na odlišná místa, což způsobuje rozdíly ve vlastnostech léčiv. Jejich účinek je rychlejší, ale trvá kratší dobu ve srovnání s DSU (DeMarsilis et al. 2022), a proto jsou využívány především k léčbě postprandiální hyperglykémie. Mezi zástupce patří repaglinid a nateglinid. Riziko hypoglykémie i nárůstu tělesné hmotnosti je nižší než u DSU. (Fialová a Vlček 2009)



Obrázek 6: Uvolňovaní inzulinu z β-buněk pankreatu (Świderska et al. 2018)

Thiazolidindiony (glitazony) patří mezi inzulinové senzitizéry. Aktivací jaderných receptorů PPARγ zvyšují expresi glukózových transportérů v inzulin-rezistentních tkáních, čímž zlepšují vstup glukózy do buněk. Jejich podávání může vést ke zvýšení tělesné hmotnosti a vzniku periferních edémů, a proto jsou kontraindikovány u pacientů se srdečním selháním (NYHA III-IV). Zástupci této skupiny jsou rosiglitazon a pioglitazon. (Fialová a Vlček 2009)

Inkretiny jsou hormony produkované v trávicím traktu v reakci na příjem potravy, které zvyšují sekreci inzulinu v závislosti na aktuální hladině glukózy v krvi. (Fialová a Vlček 2009) Nejvýznamnějším zástupcem je glukagonu podobný peptid-1 (GLP-1), který přispívá ke snížení glykémie s minimálním rizikem vzniku hypoglykémie. Stimuluje sekreci inzulinu v závislosti na glukóze, tlumí sekreci glukagonu a snižuje tak výdej glukózy hepatocyty. (DeMarsilis et al. 2022; Fialová a Vlček 2009) V centrální nervové soustavě navozuje pocit sytosti a v GIT zpomaluje vyprazdňování žaludku. (Fialová a Vlček 2009) V těle se přirozený GLP-1 velmi rychle rozkládá enzymem dipeptydilpeptidázou-4 (DPP-4), proto se v terapii užívají buď **inhibitory DPP-4** (např. sitagliptin, linagliptin, vildagliptin), nebo **analoga GLP-1** (např. liraglutid, semaglutid). (DeMarsilis et al. 2022; Fialová a Vlček 2009)

Analoga GLP-1 působí jako agonisté receptoru GLP-1 a díky modifikované struktuře mají podstatně delší biologický poločas než endogenní GLP-1. (Haluzík a Vrablík 2022) Tato skupina léčiv se v posledních letech významně vyvíjí a přitahuje pozornost pro své kardiovaskulární a renální přínosy u pacientů s T2DM. (Yao et al. 2024) Kromě zlepšení kompenzace diabetu příznivě ovlivňují lipidogram, snižují tělesnou hmotnost, krevní tlak a výskyt kardiovaskulárních komplikací. Některé z nich dokonce snižují kardiovaskulární i celkovou mortalitu, což je řadí na přední místa léčebného algoritmu. (Haluzík a Vrablík 2022) Všechna analoga GLP-1 se podávají subkutánní injekcí, přičemž semaglutid je dostupný i v perorální formě. Semaglutid byl schválen FDA pro chronickou regulaci hmotnosti u pacientů s obezitou nebo nadváhou a dalšími kardiovaskulárními rizikovými faktory. (DeMarsilis et al. 2022)

Inhibitory sodíko-glukózového kotransportéru 2 (SGLT2) blokují reabsorpci glukózy v renálních tubulech a vedou ke glukosurii, úbytku hmotnosti a snížení krevního tlaku. Mohou rovněž zvyšovat vylučování kyseliny močové, což je spojeno se zlepšením kardiovaskulárních a renálních příhod. Mezi hlavní zástupce patří dapagliflozin a empagliflozin. Tito zástupci mají klíčovou roli u pacientů s kardiovaskulárními onemocněními, srdečním selháním a chronickým onemocněním ledvin díky svému kardioprotektivnímu a nefroprotektivnímu účinku. Význam jejich podávání byl potvrzen i u pacientů s chronickým srdečním selháním se sníženou ejekční frakcí (HFrEF) a to nezávisle na přítomnosti diabetu. (DeMarsilis et al. 2022)

Ve chvíli, kdy úprava životního stylu a léčba PAD nedokáže dostatečně kontrolovat hladinu glukózy v krvi, je indikována **inzulinová terapie**. (DeMarsilis et al. 2022) Pokud není kontraindikace, doporučuje se inzulin vždy kombinovat s metforminem, a to v co nejnižší účinné dávce. Léčba obvykle začíná střednědobě působícím lidským inzulinem (NPH) na noc, případně dlouhodobě působícím analogem (glargin, determin, degludec), zejména při zvýšené glykémii nalačno. V případě potřeby se přidávají krátce působící inzuliny (lispro, aspart, glulisin) před hlavními jídly, zvláště při postprandiální hyperglykémii. (Česká diabetologická společnost 2020)

Intenzifikovaný inzulinový režim, tedy tři a více dávek inzulinu denně, nejvíce napodobuje fyziologickou sekreci inzulinu a dosahuje nejlepší kompenzace diabetu. (Česká diabetologická společnost 2020; Fialová a Vlček 2009) Inzulin se podává subkutánně, a proto může být jeho aplikace spojena s lokálními reakcemi v místě vpichu. Mezi další NÚ patří přírůstek hmotnosti a hypoglykémie, jejíž výskyt je závislý na dávce. (DeMarsilis et al. 2022)

3.4 Aktivita krevních destiček u pacientů s diabetem mellitus

U pacientů s diabetes mellitus II. typu může docházet ke zvýšené agregaci destiček, známé jako hyperagregace trombocytů, která je způsobena zvýšenou produkcí tromboxanu A_2. U pacientů s T2DM je zaznamenána vyšší syntéza i při nižší potřebě prekurzorové AA. Produkce TxA_2 navíc pozitivně koreluje s hladinou glukózy v krvi, což poukazuje na přímý vliv hyperglykémie na proagregační stav. Dále je také urychlena agregace protrombinu. Naproti tomu antikoagulační markery, jako je aktivovaný protein C, aktivační peptid proteinu C byly u T2DM sníženy. Výsledkem hyperagregace trombocytů je zvýšená pravděpodobnost kardiovaskulárních onemocnění, protože hyperagregované destičky mají tendenci blokovat cévy. (Ghoshal a Bhattacharyya 2014)

Důležitým ukazatelem destičkové aktivity je průměrný objem destiček (MPV), který bývá u pacientů s T2DM zvýšený. (Korniluk et al. 2019) Větší destičky jsou reaktivnější a exprimují více povrchových receptorů. Vyšší hodnota MPV je spojována s vyšším výskytem komplikací, zejména diabetické retinopatie a infarktu myokardu. Počet a adheze glykoproteinových receptorů (zejména GP IIb/IIIa) na povrchu trombocytů u diabetiků je zvýšená. Dále byla pozorována zvýšená hladina vWF, což může zvýšit riziko trombózy. (Ghoshal a Bhattacharyya 2014)

Na buněčné úrovni je popisována snížená aktivita Na^+/K^+-ATPázy a zvýšená aktivita Ca^{2+}-ATPázy, což vede ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a následné aktivaci destiček. (Ghoshal a Bhattacharyya 2014) Hyperglykémie zvyšuje oxidativní stres, který poškozuje endotel a inhibuje syntézu antiagregačně působícího oxidu dusnatého (NO). Naopak zvýšený oxidační stres může vést k IR a zhoršené sekreci inzulinu. (Luc et al. 2019) Zvýšená hladina volných mastných kyselin (FFA z angl. *free fatty acids*), typická pro T2DM, snižuje aktivitu ADPázy a přispívá k proagregačnímu prostředí. (Jagroop a Mikhailidis 2015)

Vzhledem k těmto změnám je u pacientů s T2DM kromě kompenzace glykémie nezbytná i farmakoterapie zaměřená na prevenci kardiovaskulárních komplikací, která zahrnuje antiagregační léčiva, léky snižující hladinu lipidů (zejména statiny) a antihypertenziva. (Jagroop a Mikhailidis 2015)

4 Cíl práce

Cílem této práce bylo porovnat agregaci krevních destiček u pacientů s diabetem mellitus II. typu a u zdravých dobrovolníků. Zkoumalo se, jak je agregace ovlivněna stimulací sedmi různými induktory.

5 Experimentální část

5.1 Odběr vzorku

Odběru krve se zúčastnili pacienti, kteří předem podepsali informovaný souhlas a dokument týkající se ochrany osobních údajů (GDPR). Odběrovým místem byla Fakultní nemocnice Hradec Králové, kde odběry prováděla kvalifikovaná zdravotní sestra. Každý pacient se dostavil k odběru v ranních hodinách nalačno, s doporučením zvýšeného příjmu vody, nikoli kávy, čaje nebo slazených nápojů. Pacienti byli rovněž informováni, aby večer před odběrem nekonzumovali alkoholické nápoje a alespoň 48 hodin před odběrem neužívali nesteroidní antiflogistika. K odběru se dostavilo celkem 45 pacientů s diabetem mellitus II. typu, kteří si s sebou přinesli vzorek ranní moči.

Před samotným odběrem byl s každým pacientem vyplněn dotazník zaměřený na klíčové informace důležité pro experiment – pohlaví, věk, výška, hmotnost, kouření, aktuální diagnózy a užívaná medikace. Po vyplnění dotazníku a podepsání souhlasu byl proveden odběr ve stanoveném pořadí. Nejprve bylo odebráno 6 ml srážlivé krve na sérum ke stanovení hladin lipidů (LDL, HDL cholesterol, triglyceridy), glykémie a zánětlivých markerů. Následně bylo odebráno 2x10 ml krve do heparinizovaných zkumavek pro analýzu agregace krevních destiček, která byla využita v rámci experimentu této diplomové práce. Po odběru byly vzorky transportovány na Farmaceutickou fakultu, kde byla přesně 30 minut po odběru zahájena analýza.

5.2 Charakteristika pacientů

Do studie bylo zařazeno celkem 45 pacientů s diabetem mellitus II. typu. Mezi kritéria pro zařazení do experimentu patřil věk nad 18 let, potvrzená diagnóza T2DM, neužívání léků ovlivňujících funkci trombocytů a také nepodání NSAID během 14 dnů před odběrem krve. Základní charakteristiky pacientů a jejich procentuální rozdělení jsou uvedeny v tabulce 1. a podrobné informace o jednotlivých pacientech jsou zpracovány v tabulce 2.

Kontrolní skupinu tvořilo 53 zdravých dobrovolníků z předchozího experimentu. Kritériem pro zařazení byl taktéž věk nad 18 let a dobrý zdravotní stav, zejména bez diabetu a bez užívání léků ovlivňujících funkci trombocytů.

Tabulka 1. Charakteristika pacientů s diabetem mellitus II. typu

		Muži	%	Ženy	%	Celkem	%
Počet, n		29	64,44	16	35,56	45	100
Věk	40-49	6	13,33	3	6,67	9	20
	50-59	11	24,44	6	13,33	17	37,78
	60-69	8	17,78	1	2,22	9	20
	70-79	4	8,89	4	8,89	8	17,78
	80+	0	0	2	4,44	2	4,44
BMI *	18,5-24,9	4	9,09	1	2,27	5	11,36
	25,0-29,9	5	11,36	5	11,36	10	22,73
	30,0-34,9	8	18,18	4	9,09	12	27,27
	35,0-39,9	5	11,36	3	6,82	8	18,18
	40+	6	13,63	3	6,82	9	20,45
Kouření **	A	8	17,78	0	0	8	19,05
Onemocnění	DM2	29	64,44	16	35,56	45	100
	AH	19	42,22	9	20	28	62,22
	Dyslipidémie	11	24,44	12	26,67	23	51,11
	Hyperurikémie	9	20	1	2,22	10	22,22
	ŠŽ	1	2,22	3	6,67	4	8,89
	jater	7	15,56	0	0	7	15,56

Vysvětlivky: BMI – body mass index, A – ano, DM2 – diabetes mellitus 2. typu, AH – arteriální hypertenze, ŠŽ – štítná žláza

*Pro daný údaj byl dostupný záznam pouze u 44 pacientů. Procentuální hodnoty jsou vztaženy k počtu n = 44.

** Procentuální hodnoty jsou vztaženy k počtu n = 42.

Tabulka 2. Podrobná charakteristika pacientů

Pacient	Věk	Pohlaví	Kuřák	Jiná Onemocnění	Inzulin	Antidiabetika	Antilipidemika	Antihypertenziva	Ostatní léčiva
1	69	M	N	AH, BHP, RI, hyperurikémie	N	Metformin, empagliflozin	Atorvastatin	Perindopril, amlodipin, indapamid	Alopurinol, tamsulosin
2	56	M	N	AH, steatóza, dyslipidémie, hyperurikémie, obezita	N	Metformin, semaglutid	Rosuvastatin, ezetimib	Perindopril, indapamid	Alopurinol
3	50	Ž	N	Thyreoiditida, hyperurikémie, obezita	A	Metformin, liraglutid, dapagliflozin	-	Telmisartan, indapamid	Alopurinol
4	46	M	A	Obezita	A	Liraglutid	-	-	-
5	59	M	N	-	A	-	-	-	-
6	64	M	N	Dyslipidémie, AS, obezita, hyperurikémie	A	Metformin, liraglutid	Rosuvastatin	Perindopril, indapamid	Alopurinol, flutikason, flavonoidy
7	58	Ž	N	Dyslipidémie	N	Metformin	Atorvastatin, fenofibrát, ezetimib	-	-
8	46	M	A	AH, deprese, neuropatie, obezita	N	Metformin, sitagliptin	-	Valsartan, hydrochlorothiazid	Pantoprazol, pregabalin
9	74	M	N	AH, obezita, transplantace jater	A	Linagliptin	Atorvastatin	Ramipril, lerkanidipin	Takrolimus, methyldopa, doxazosin, prednison, kys. ursodeoxycholová
10	57	M	N	AH	A	Metformin, liraglutid	Atorvastatin	Perindopril, amlodipin	-

Pacient	Věk	Pohlaví	Kuřák	Jiná Onemocnění	Inzulin	Antidiabetika	Antilipidemika	Antihypertenziva	Ostatní léčiva
11	83	Ž	N	AH, obezita, dyslipidémie, bércové vředy	N	Linagliptin	Atorvastatin	Perindopril, amlodipin, indapamid, rilmenidin, betaxolol, furosemid	Spironolakton, tramadol/paracetamol, metamizol, flavonoidy
12	58	M	A	AH, obezita, dyslipidémie	A	-	-	Amilorid, furosemid	Pantoprazol, duloxetin, pregabalin, pramipexol
13	52	M	A	AH, obezita, AB, deprese, infekce močových cest, RI	A	Metformin	-	-	Piperacilin/tazobaktam, paracetamol i.v, omeprazol, klonazepam, amitriptylin
14	64	M	N	AH, NASH, dyslipidémie, stav po akutní pankreatitidě, obezita	N	Metformin, empagliflozin	Rosuvastatin, fenofibrát, ezetimib	Metoprolol, amlodipin, ramipril	Milgamma (vit B)
15	66	M	N	Neuropatie, diabetická noha, glaukom	A	-	-	-	Fraxiparin, diazepam, biseptol
16	57	M	N	Deprese, hyperurikémie, pneumonie	A	-	-	Perindopril, amlodipin, indapamid	Metamizol+pitofenon, latanoprost, cefuroxim, klarithromycin
17	40	Ž	N	Dyslipidémie	A	Metformin, dapagliflozin	Atorvastatin	-	-
18	60	M	-	AH, VAS, hepatopatie, obezita	A	Metformin, dapagliflozin	-	Perindopril, indapamid, amlodipin, metoprolol	Spironolakton, nimesulid, alopurinol, pregabalin
19	68	M	N	AH, obezita, spánková apnoe, dyslipidémie	A	Pioglitazon	Fenofibrát	Perindopril, amlodipin, indapamid, moxonidin	Tramadol/paracetamol, metamizol

Pacient	Věk	Pohlaví	Kuřák	Jiná Onemocnění	Inzulin	Antidiabetika	Antilipidemika	Antihypertenziva	Ostatní léčiva
20	49	M	-	AH, steatóza, dyslipidémie, pankreatitida	A	Metformin, empagliflozin	Atorvastatin, fenofibrát	Ramipril	Pantoprazol, pankreatin
21	42	M	N	AH, obezita, dyslipidémie, hyperurikémie, psychotická porucha	A	-	Atorvastatin, fenofibrát	Ramipril	Lansoprazol, alopurinol, haloperidol, amisulpirid
22	69	M	N	CHSS, mitrální insuficience, diabetická noha	N	Metformin, sitagliptin, empagliflozin	Rosuvastatin	Furosemid, bisoprolol, ramipril	Spironolakton, amoxicilin, tramadol/paracetamol, oxazepam, citalopram
23	70	M	A	AH, obezita, dyslipidémie	N	Metformin, semaglutid	-	Telmisartan, indapamid, betaxolol	-
24	51	Ž	N	Dyslipidémie, obezita	A	Liraglutid	Atorvastatin, fenofibrát	-	Oxazepam
25	58	M	A	AH, obezita	A	Metformin, dulaglutid	Rosuvastatin	Ramipril	-
26	73	Ž	N	AH, AB, dyslipidémie, neuropatie	N	Metformin, semaglutid	Rosuvastatin	Kandesartan	Gabapentin, desloratadin, dorzolamid, flavonoidy
27	75	M	A	AH, tinnitus, dyslipidémie, obezita, adenom levé nadledviny	N	Metformin, linagliptin	-	Telmisartan, moxonidin, betaxolol	Itoprid, pregabalin, amitriptylin
28	55	M	N	AH, VAS, CHŽI, obezita	A	-	-	Telmisartan, indapamid	Tamsulosin, sertralin, pantoprazol, flavonoidy
29	55	Ž	N	AH, RS, obezita, dyslipidémie	A	-	Atorvastatin	Perindopril	-
30	79	Ž	N	AH, dyslipidémie	A	-	Atorvastatin	Perindopril, amlodipin	Levothyroxin, tramadol/paracetamol, metamizol, escitalopram

Pacient	Věk	Pohlaví	Kuřák	Jiná Onemocnění	Inzulin	Antidiabetika	Antilipidemika	Antihypertenziva	Ostatní léčiva
31	67	Ž	N	AH, VAS, obezita, dyslipidémie	A	Metformin, semaglutid	Atorvastatin	Telmisartan	-
32	51	M	A	Chronická pankreatitida, ezofagitida	A	-	-	-	Pankreatin, kyselina listová, B komplex, ferrosi sulfas
33	72	Ž	N	AH, obezita, dyslipidémie, mitrální insuficience	A	Metformin	Rosuvastatin	Valsartan, bisoprolol	-
34	63	M	N	CHSS, ICHDK, obezita	A	Semaglutid	-	Perindopril, indapamid, bisoprolol	-
35	47	M	N	Akutní pankreatitida	A	-	-	Ramipril	Pantoprazol, levocetirizin
36	57	Ž	N	AH, obezita, dyslipidémie, absces hlavy	A	-	Atorvastatin	Betaxolol	Amoxicilin
37	74	Ž	N	Charcotova choroba	A	Metformin	Atorvastatin, fenofibrát	Furosemid, bisoprolol	Leflunomid, pantoprazol, methylprednisolon, levothyroxin, pregabalin
38	58	M	N	Spánková apnoe, obezita, hypotyreóza, hyperurikémie	N	-	-	Losartan, indapamid	Warfarin, levothyroxin, alopurinol, flavonoidy
39	48	Ž	N	AH, obezita, psoriáza	A	Metformin, semaglutid	-	Perindopril, indapamid, bisoprolol	-
40	75	M	N	AH, obezita, spánková apnoe, CHSS	A	-	-	Ramipril, propranolol	Alopurinol, tamsulosin, trospium

Pacient	Věk	Pohlaví	Kuřák	Jiná Onemocnění	Inzulin	Antidiabetika	Antilipidemika	Antihypertenziva	Ostatní léčiva
41	45	Ž	N	AH, obezita	N	Metformin, semaglutid	-	Ramipril	-
42	57	Ž	N	Dyslipidémie, osteoartikulární tuberkulóza	A	Metformin	Atorvastatin	-	-
43	80	Ž	N	ICHDK, diabetická noha, obezita	A	-	Rosuvastatin	-	Pantoprazol
44	58	M	-	AH, steatóza, dyslipidémie	A	Metformin, dulaglutid	-	Telmisartan, indapamid	Gabapentin
45	49	M	N	AH, obezita, steatóza, dyslipidémie	A	Metformin, empagliflozin		Perindopril, bisoprolol	Alopurinol, flavonoidy, zolpidem

Vysvětlivky: Ž – žena, M – muž, A – ano, N – ne, AH – arteriální hypertenze, BHP – benigní hyperplazie prostaty, RI – renální insuficience, AS – aortální stenóza, AB – astma bronchiale, NASH – nealkoholická steatohepatitida, VAS – vertebrogenní algický syndrom, CHSS – chronické srdeční selhávání, CHŽI – chronická žilní insuficience, RS – roztroušená skleróza, ICHDK – ischemická choroba dolních končetin

5.3 Použitý materiál

V experimentu byl používán fyziologický roztok od firmy B. Braun (Melsungen, Německo) a dimethylsulfoxid (DMSO) od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Bylo použito celkem sedm induktorů agregace. Kyselina arachidonová (AA), adenosindifosfát (ADP) a peptid aktivující trombinový receptor 6 (TRAP-6, z angl. *thrombin receptor – activating peptide 6*) pochází z firmy Roche (Basel, Švýcarsko). Faktor aktivující destičky – 16 (PAF-16, z angl. *platelet-activating factor 16*), ristocetin a stabilní syntetický analog endoperoxidového prostaglandinu PGH_2 (U-46619) od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Posledním používaným induktorem byl kolagen od firmy Diagnostica, a.s. (Praha, Česká republika).

5.4 Impedanční agregometrie

Impedanční agregometrie je jednou z metod používaných k měření agregace krevních destiček. Její princip spočívá v detekci změn elektrické impedance, které vznikají při interakci destiček s kovovými elektrodami ve vzorku plné krve. (Baumgarten et al. 2010) Použití plné krve při testování in vitro eliminuje potřebu časově náročné centrifugace. (Roche Diagnostics 2025) Tuto metodu poprvé popsali Cardinal a Flower. (Hanke et al.2010)

Specifickou variantou této metody je víceelektrodová agregometrie (MEA, z angl. *Multiple electrode aggregometry*), která využívá analyzátor Multiplate. Tento přístroj umožňuje stanovit funkce krevních destiček v malém množství plné krve. Plná krev představuje fyziologické prostředí, ve kterém probíhá agregace destiček přirozeně (*in vivo*). (Roche Diagnostics 2025)

Zařízení má pět měřících kanálů, které umožňují paralelní testování. Využívá se jednorázová testovací cela, která obsahuje dvě rovné, vysoce vodivé měděné dráty s postříbřeným povrchem, které zajišťují kontakt se vzorkem krve. (Baumgarten et al. 2010; Roche Diagnostics 2025) Na těchto elektrodových drátech (senzorech) se detekuje změna impedance způsobená adhezí a agregací aktivovaných destiček. V každé cele je navíc umístěno jednorázové magnetické míchadlo, které během měření zajišťuje konstantní promíchávání směsi vzorku a činidel. (Baumgarten et al. 2010)

Změna impedance je zaznamenávána nezávisle každým senzorem po dobu šesti minut. (Baumgarten et al. 2010; Hanke et al.2010) Přístroj tak poskytuje dvě nezávislé agregační křivky. (Baumgarten et al. 2010) Výsledkem měření jsou parametry jako je rychlost agregace, maximální agregace, procentuální rozdíl mezi oběma křivkami, korelační koeficient, a

především plocha pod křivkou (AUC, z angl. *area under the curve*). (Roche Diagnostics 2025) AUC je považována za nejrelevantnější ukazatel celkové agregace, protože je ovlivněna jak rychlostí, tak maximální hodnotou agregace. (Hanke et al.2010) V případě, že se křivky liší o více než 20 %, nebo korelační koeficient je menší než 0,98, přístroj signalizuje nutnost opakování měření. Duplicitní senzory tak slouží jako vnitřní kontrola přesnosti měření. (Baumgarten et al. 2010)

5.5 Metodika měření agregace trombocytů

5.5.1 Příprava činidel před experimentem

Většina potřebných činidel byla předem připravena ve zkumavkách a uchovávána při teplotě -20 °C. Konkrétně se jednalo o tato činidla a jejich koncentrace: AA (15 mM), ADP (0,2 mM), TRAP (1 mM), a U-46619 (1 mM). AA, ADP a TRAP byly po rozmrazení připravené k přímému použití, ostatní uvedená činidla bylo nutné dále ředit. Ristocetin byl uchováván v lednici společně s fyziologickým roztokem, koncentrovaným zásobním roztokem kolagenu a jeho ředícím roztokem. Fyziologický roztok byl před zahájením experimentu vložen do agregometru za účelem zahřátí na teplotu 37 °C. Těsně před začátkem experimentu byl z mrazícího boxu o teplotě -80 °C vybrán PAF, ke kterému byl ihned přidán ethanol. Roztok U-46619 se nacházel v odděleném boxu v mrazáku a těsně před jeho použitím byl naředěn fyziologickým roztokem. Většina činidel je za daných podmínek stabilní po dobu čtyř týdnů. Výjimku tvoří PAF a U-46619 s delší dobou použitelnosti, naopak ristocetin má použitelnost omezenou na jeden týden. Postup přípravy a koncentrace finálních pracovních roztoků induktorů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Příprava pracovních roztoků induktorů

Induktor	Koncentrace zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku	Skladování	Příprava pracovního roztoku	Koncentrace pracovního roztoku
AA	15 mM	-	-20 °C	Po rozmrazení připravené k použití	15 mM
Kolagen	1 mg/ml	20 µl	Lednice	Přidat 180 µl ředícího roztoku kolagenu	100 µg/ml
	100 µg/ml	20 µl	Připraven před ředěním	Přidat 80 µl ředícího roztoku kolagenu	20 µg/ml
ADP	0,2 mM	-	-20 °C	Po rozmrazení připravené k použití	0,2 mM
TRAP	1 mM	-	-20 °C	Po rozmrazení připravené k použití	1 mM
Ristocetin	12,5 mM	-	Lednice	Připraven k použití	12,5 mM
	12,5 mM	10 µl		Přidat 240 µl fyziologického roztoku	0,5 mM
PAF	2 mM	10 µl	-80 °C	Přidat 90 µl ethanolu	200 µM
	200 µM	10 µl	Připraven před ředěním	Přidat 790 µl fyziologického roztoku (maximálně 10 minut před začátkem experimentu)	2,5 µM
U-46619	1 mM	10 µl	-20 °C	Přidat 990 µl fyziologického roztoku (těsně před použitím)	10 µM

5.5.2 Průběh experimentu

Do kyvety umístěné v agregometru bylo nepipetováno 300 µl fyziologického roztoku zahřátého na 37 °C, následně 300 µl krve odebrané z heparinizovaných zkumavek, které bylo nutné před každým kolem experimentu lehce promíchat. Poté bylo přidáno 5 µl DMSO, nebo testovaného inhibitoru agregace a nechalo se inkubovat po dobu 3 minut. K této směsi byl přidán induktor agregace a změny byly monitorovány po dobu 6 minut. Celkem bylo provedeno 9 kol, kdy každé následující kolo začínalo přesně 15 minut od začátku předešlého kola.

5.5.3 Statistická analýza

Na analýzu údajů z experimentální části byl použit program GraphPad Prism 10.0.2 (San Diego, Kalifornie, USA). Pro porovnání agregace dvou skupin byl použit nepárový t-test nebo Mannův-Whitneyův test. Výsledky jsou prezentované jako medián s 95 % konfidenčním intervalem.

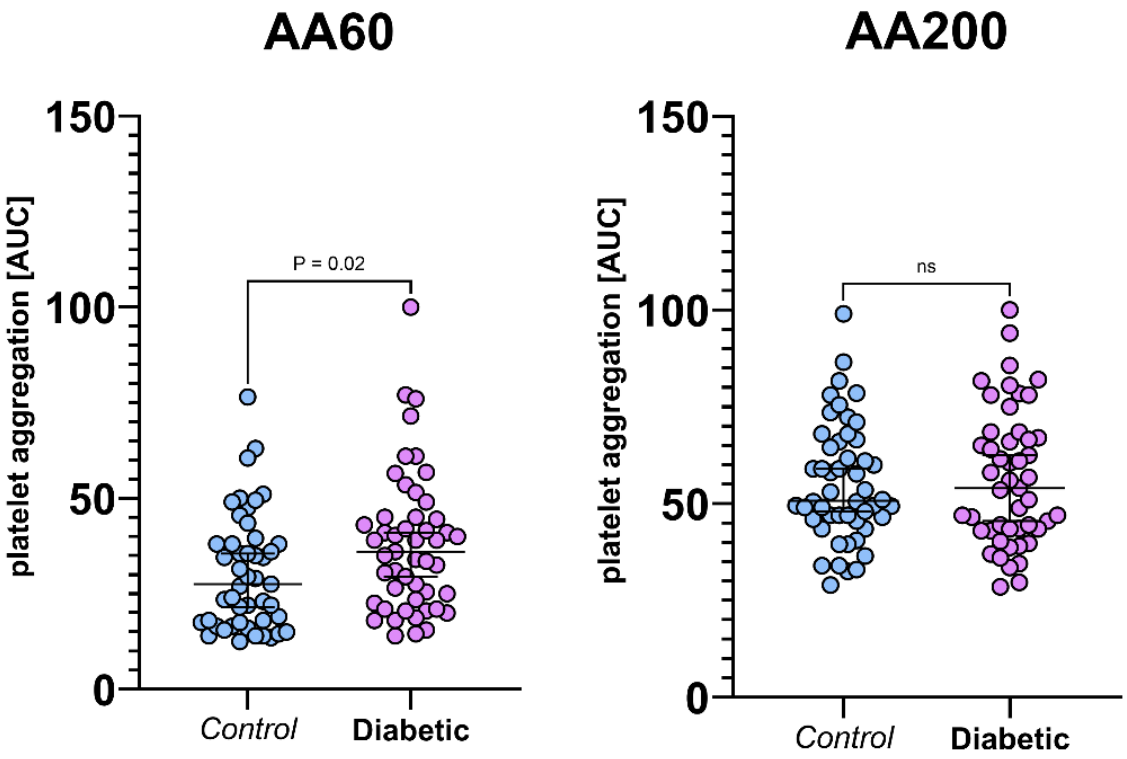
6 Výsledky

Agregace krevních destiček byla hodnocena po stimulaci sedmi různými induktory – AA, kolagen, ristocetin, ADP, TRAP a U-46619.

Výsledky agregace byly vyjádřena pomocí hodnoty AUC (*area under the curve*), která odráží celkovou míru agregace v průběhu času. Hodnoty AUC pro jednotlivé induktory jsou znázorněny v následujících grafech. Všechny grafy jsou uvedeny v angličtině, protože jsou součástí připravované publikace v mezinárodním vědeckém časopise (Paclíková et al. 2025).

6.1 Agregace trombocytů indukovaná AA

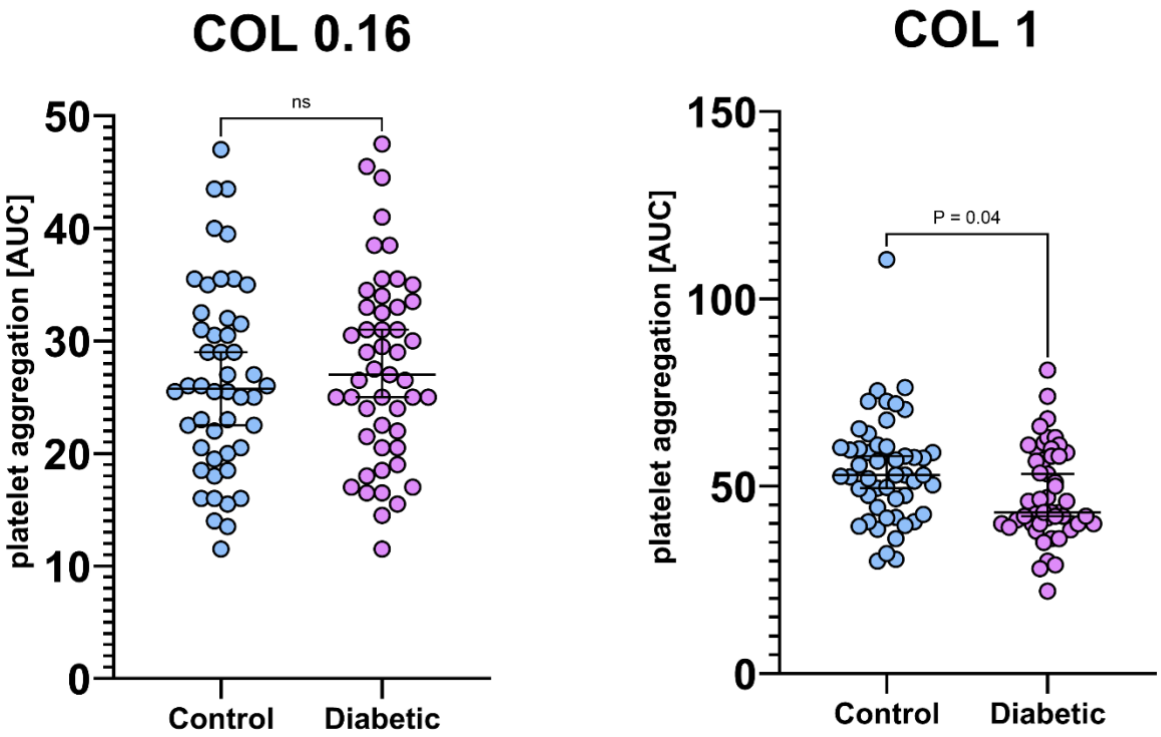
Agregace krevních destiček byla vyvolána kyselinou arachidonovou ve dvou koncentracích - 60 µM a 200 µM. Celkově byla agregace destiček vyšší u pacientů s T2DM. Zatímco při vyšší koncentraci AA nebyl mezi skupinami zaznamenán statisticky významný rozdíl, při nižší koncentraci byla agregace destiček u diabetických pacientů statisticky významnější (p = 0,02) ve srovnání s kontrolní skupinou. Na základě těchto výsledků (obr. 7) lze konstatovat, že koncentrace 60 µM byla efektivnějším induktorem agregace u diabetiků II. typu.



Obr. 7 Agregace vyvolaná kyselinou arachidonovou o koncentracích 60 µM (vlevo) a 200 µM (vpravo)

6.2 Agregace trombocytů indukovaná kolagenem

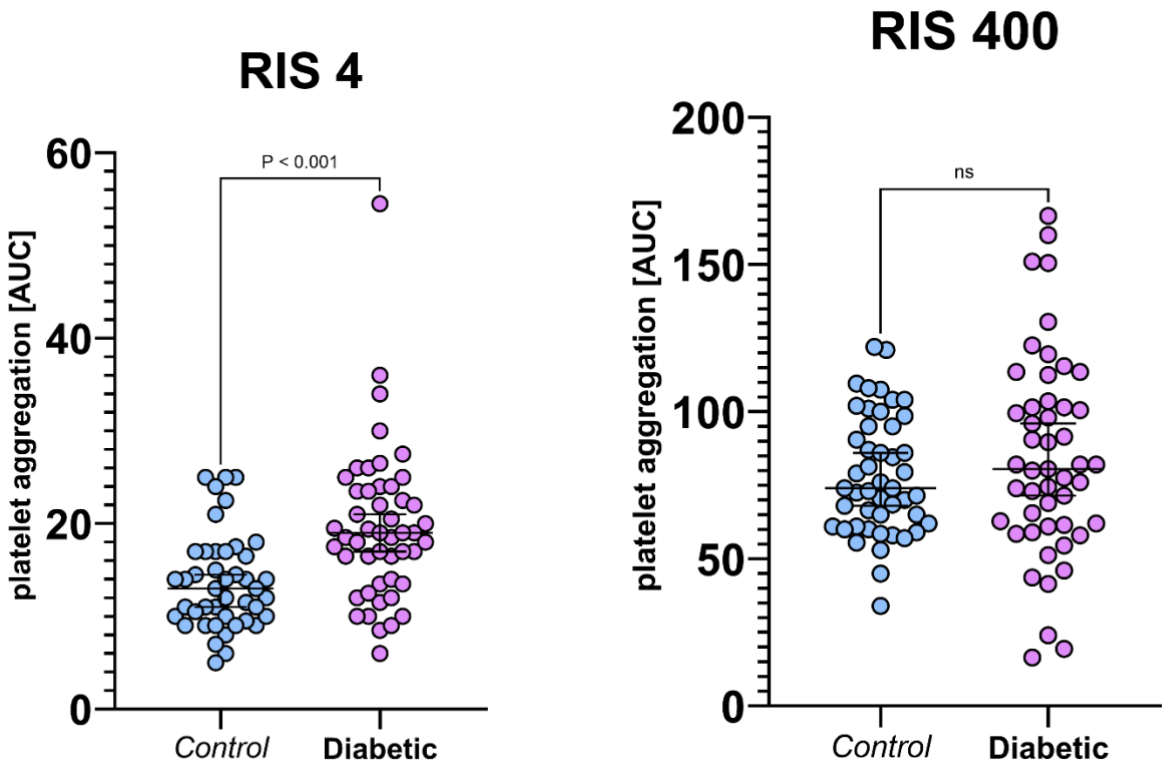
Agregace krevních destiček byla rovněž indukována kolagenem ve dvou koncentracích – 0,16 µM a 1 µM. Statisticky významný rozdíl (p = 0,04) byl zaznamenán u vyšší koncentrace kolagenu, která působila jako účinnější induktor agregace u zdravých dobrovolníků ve srovnání s diabetickými pacienty. Hodnoty AUC jsou znázorněny na obr. 8.



Obr. 8 Agregace trombocytů vyvolaná kolagenem o koncentracích 0,16 µM (vlevo) a 1 µM (vpravo)

6.3 Agregace trombocytů indukovaná ristocetinem

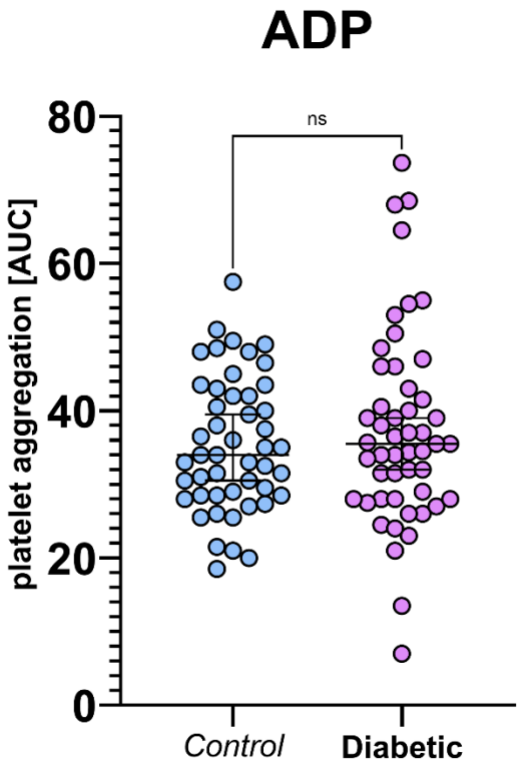
Agregace trombocytů byla indukována ristocetinem také ve dvou koncentracích – 4 µM a 400 µM. Při nižší koncentraci byla agregace statisticky významně vyšší u pacientů s T2DM ve srovnání se zdravými dobrovolníky (p <0,001). Při vyšší koncentraci mezi skupinami statisticky významný rozdíl zaznamenán nebyl. Podle hodnot AUC (obr. 9) se jako účinnější induktor ukázal ristocetin v koncentraci 4 µM, a to zejména u diabetických pacientů.



Obr. 9 Agregace trombocytů vyvolaná ristocetinem o koncentracích 4 µM (vlevo) a 400 µM (vpravo)

6.4 Agregace trombocytů indukovaná ADP

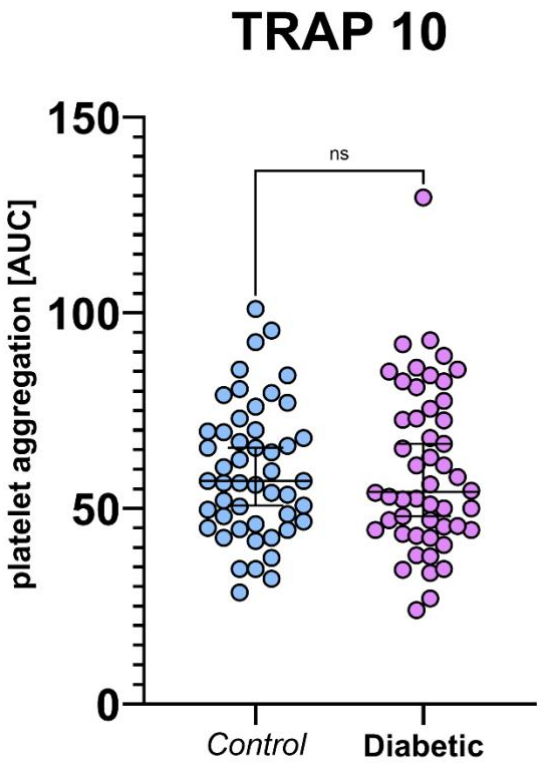
Agregace krevních destiček byla indukována adenosindifosfátem v koncentraci 5 µM. Podle obr.10 se agregace u diabetiků jeví mírně vyšší, avšak rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl.



Obr. 10 Agregace trombocytů vyvolaná ADP o koncentraci 5 µM

6.5 Agregace trombocytů indukovaná TRAP

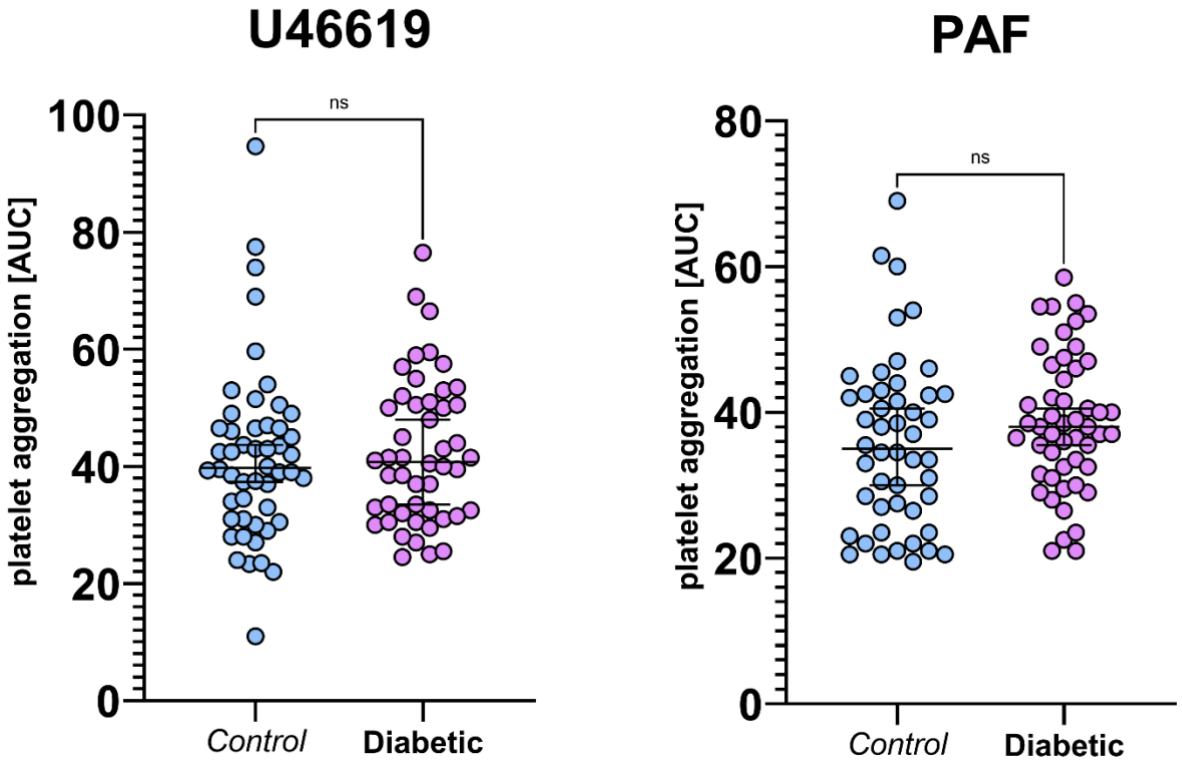
Agregace krevních destiček byla indukována peptidem napodobujícím účinek trombinu bez enzymatické aktivity (TRAP) v koncentraci 10 µM. Podle mediánu na obr. 11 se TRAP jeví jako účinnější induktor agregace u kontrolní skupiny, avšak rozdíl nebyl statisticky významný.



Obr. 11 Agregace trombocytů vyvolaná TRAP o koncentraci 10 µM

6.6 Agregace trombocytů indukovaná U-46619 a PAF

Agregace krevních destiček byla indukována také pomocí látek U-46619 a PAF. V obou případech byla indukce podle mediánu vyšší u pacientů s T2DM ve srovnání se zdravými dobrovolníky, rozdíly však nebyly statisticky významné (obr.12).



Obr. 12 Agregace trombocytů vyvolaná látkou U-46619 o koncentraci 80 nM (vlevo) a PAF o koncentraci 20 nM (vpravo)

7 Diskuse

Trombocyty jsou klíčovými buňkami primární hemostázy a hrají zásadní roli v patogenezi trombotických onemocnění. (Zufferey et al. 2012) Za fyziologických podmínek se aktivují pouze při poškození cévní stěny, avšak u některých patologických stavů, jako je diabetes mellitus, dochází k jejich aktivaci i bez zjevného poškození cév. (Carazo et al. 2024) U těchto pacientů je prokazatelná zvýšená aktivace a agregace trombocytů, což významně přispívá k vysoké kardiovaskulární morbiditě a mortalitě. (Zhou et al. 2020) Ve srovnání s nediabetiky mají tito pacienti vyšší riziko infarktu myokardu a častěji prodělávají rekurentní ischemické příhody. (Singam et al. 2022)

Jedním z hlavních projevů dysfunkce destiček u diabetiků je jejich zvýšená agregabilita, která byla popsána již v 60. letech a potvrzená řadou studií. (Feroni et al. 2004; Kakouros et al. 2011; Kim et al. 2013) Hyperreaktivita destiček je důsledkem kombinace více mechanismů, mezi které patří metabolické odchylky (hyperglykémie, inzulínová rezistence, dyslipidémie), oxidační stres a endoteliální dysfunkce. (Feroni et al. 2004; Kakouros et al. 2011) U diabetiků je zvýšená degranulace destiček a syntéza tromboxanu, což podporuje další aktivaci a agregaci. Současně je narušena fyziologická vazodilatační a antiagregační odpověď, zejména vlivem snížené citlivosti na prostacyklin (PGI_2) a oxid dusnatý. (Feroni et al. 2004)

Chronická hyperglykémie vede k nadprodukci reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují oxidační stres, přispívají k inzulínové rezistenci a přímo aktivují trombocyty zvýšeným uvolňováním intracelulárního vápníku, čímž zesilují jejich agregaci. (Kakouros et al. 2011; González et al. 2023) ROS dále narušují endoteliální funkci a produkci NO a prostacyklinu. (Kakouros et al. 2011) ROS stimulují transkripční faktory, které zvyšují expresi prozánětlivých cytokinů (IL-1β, TNF-α, IL-6) a adhezních molekul, čímž podporují zánětlivé a prokoagulační prostředí, vyvolávají fenotypové změny endoteliálních buněk a zvyšují produkci tkáňového faktoru (TF), hlavního spouštěče koagulační kaskády v aterosklerotických plátech. Tyto procesy dále zvyšují trombocytární aktivitu. (Feroni et al. 2004)

Trombocyty disponují inzulinovými receptory (IR), jejichž aktivace u zdravých jedinců vede ke zvýšení cAMP, snížení trombinem indukované agregace a snížení produkce proagregačního tromboxanu B_2 (neaktivní metabolit tromboxanu A_2 sloužícího jako jeho marker), který poukazuje na sníženou aktivitu trombocytů. U diabetiků s inzulinovou rezistencí je tento regulační mechanismus narušen, hladiny cAMP jsou nízké a produkce TXA_2 zvýšená, což vede k hyperreaktivitě trombocytů. (Kakouros et al. 2011)

Významnou roli hraje také aktivace proteinkinázy C (PKC), klíčového mediátoru signálních drah pro různé proagregační agonisty. (Kakouros et al. 2011) Vstup glukózy do destiček není regulován hladinou inzulinu v krvi, a proto intracelulární koncentrace glukózy přímo odpovídá její plazmatické koncentraci. (Feroni et al. 2004) Dlouhodobá hyperglykémie tak vede nejen k aktivaci PKC, ale také k neenzymatické glykaci membránových proteinů, což mění jejich strukturu a konformaci a zároveň může ovlivnit uspořádání lipidů v membráně. Výsledkem je zvýšená exprese receptorů, zejména glykoproteinu IIb/IIIa, což zvyšuje citlivost destiček na potencionální ligandy. (Feroni et al. 2004) GP IIb/IIIa je hlavní receptor pro fibrinogen a vWF, a jeho zvýšená exprese usnadňuje propojení destiček a tvorbu trombu. (Gremmel et al. 2016; Hashemzadeh et al. 2023) Hyperglykémie dále podporuje uvolňování větších trombocytů, nesoucích více receptorů GPIb a GP IIb/IIIa s vyšší kapacitou tvorby TXA_2. U diabetiků je rovněž zvýšená exprese i dalších receptorů, například $P2Y_{12}$, což také podporuje jejich hyperagregabilitu. (Kakouros et al. 2011)

Na základě výše zmíněných patofyziologických mechanismů je zřejmé, že trombocyty pacientů s diabetem reagují odlišně než trombocyty zdravých jedinců a jejich odpověď závisí na použitém agonistovi. Existují endogenních sloučeniny, jako například ADP, AA, PAF či kolagen, avšak některé signální molekuly jsou experimentálně nevhodné z důvodu své nestability, velikosti nebo vícečetným účinkům, a proto se častěji používají syntetické analogy. (Carazo et al. 2024) V této diplomové práci bylo použito sedm různých induktorů, které působí na trombocyty různými mechanismy, aby bylo možné zmapovat různé způsoby jejich aktivace a agregace. Jedná se o aktivátor receptoru pro vWF (ristocetin) a kolagen, které působí v primární fázi aktivace trombocytů, zejména podporou adheze k poškozené vrstvě. Dále byly použity ADP, faktor aktivující trombocyty (PAF) a peptid TRAP, který napodobuje účinek trombinu, aniž by vykazoval enzymatickou aktivitu. Tyto tři induktory spouštějí specifické signalizační dráhy vedoucí k aktivaci trombocytů. Kyselina arachidonová a analog tromboxanu U-46619 podporují sekundární agregaci a zesílení trombocytární odpovědi. AA stimuluje tvorbu endogenního tromboxanu A_2, zatímco U-46619 přímo aktivuje tromboxanové receptory. (Paclíková et al. 2025)

Kolagen a ristocetin hrají klíčovou roli v iniciační fázi aktivace destiček. Po poranění cévy dochází nejprve k odhalení subendoteliálního kolagenu, který interaguje s vWF a receptory na povrchu trombocytů, což vede k jejich aktivaci. V tomto experimentu však tyto induktory vykazovaly u diabetiků vzájemně odlišný účinek. Zatímco ristocetin vyvolal vyšší agregaci trombocytů u diabetiků ve srovnání se zdravými jedinci, kolagen naopak vyvolal účinek opačný. Agregace byla u diabetiků po podání kolagenu nižší než u kontrolní skupiny,

což je v rozporu s očekáváním a s některými publikovanými daty. Například Tang et al. (2011) prokázali zvýšenou aktivaci a agregaci trombocytů aktivovaných kolagenem při hyperglykémii. Zvýšenou agregaci u diabetiků uvádějí také studie Yamagishim et al. (2001) a Sağcan et al. (2002). Naopak studie Dittmar et al. (1994) nezaznamenala rozdíly v adhezi na kolagen mezi diabetem I. a II. typu a kontrolními subjekty, což naznačuje, že adhezivita destiček na kolagen nemusí být u diabetiků zvýšena.

Ristocetin vykazoval očekávaný účinek zvýšené agregace u diabetiků při nízké koncentraci (4 μM), což odpovídá jejich zvýšené expresi GP IIb/IIIa u těchto pacientů. Zvýšenou aktivitu destiček u diabetiků popisuje také studie Lufkin et al. (1979), která uvádí zvýšené hladiny ristocetinem aktivovaného von Willebrandova faktoru ve všech skupinách diabetiků, včetně pacientů s lehkou formou diabetu bez známek cévního onemocnění. Při vysoké koncentraci ristocetinu však rozdíl mezi skupinami prakticky zmizel. Jedním z možných vysvětlení je, že vysoká koncentrace ristocetinu může vést k téměř úplnému obsazení receptorů GP Ib-IX-V, což způsobuje dosažení maximální agregace. Tento mechanismus však nebyl přímo popsán.

Tři induktory cílené na specifické signální dráhy v tomto experimentu neprokázaly statisticky významné rozdíly mezi diabetiky a kontrolní skupinou. Jedná se o ADP cílící na Gi-typ receptorů, PAF cílící na Gq receptory, a peptid TRAP-6, který aktivuje výhradně PAR-1 receptory spojené s Gq kaskádou. Statisticky významné rozdíly nebyly zaznamenány ani u agonisty tromboxanových receptorů U-46619.

Kyselina arachidonová je prekurzorem tromboxanu A_2 v trombocytech. TXA_2 je významný induktor agregace destiček, který vyvolává uvolnění obsahu granul, stimuluje další tvorbu TXA_2 a prostřednictvím aktivace PKC vede k aktivaci GP IIb/IIIa. (Rucker a Dhamoon 2025) V provedeném experimentu byla potvrzena zvýšená agregace trombocytů u diabetiků při koncentraci 60 μM. Studie Morita et al. (1983) rovněž prokázala zvýšenou koncentraci AA u diabetiků. Hladina AA ve fosfolipidech destiček diabetiků byla nepřiměřeně vysoká, což naznačuje urychlený systém začleňování AA do fosfolipidů destiček při diabetu. Zvýšený obsah esterifikované kyseliny arachidonové ve fosfolipidech tak může modulovat produkci TXA_2 při diabetu.

8 Závěr

V této diplomové prací byla hodnocena odpověď trombocytů pacientů s diabetem mellitus II. typu na různé agonisty s cílem porovnat jejich reaktivitu se zdravou kontrolní skupinou. Výsledky ukázaly, že destičky diabetiků nereagují jednotně. Zatímco u ristocetinu a kyseliny arachidonové byla zaznamenána vyšší agregace, kolagen vyvolal odpověď nižší. Ostatní testované látky (ADP, PAF, TRAP, U-46619) nevykázaly statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami.

Celkově lze konstatovat, že trombocyty pacientů s diabetem mellitus II. typu vykazují odlišnou odpověď ve srovnání s trombocyty zdravých osob, avšak jednoznačně zvýšená reaktivita u diabetiků se nepotvrdila. Zjištěné rozdíly poukazují na komplexní povahu ovlivnění funkce destiček při diabetu. Výsledky tak podporují potřebu dalších studií, zejména v oblasti vlivu hyperglykémie, inzulinové rezistence a komorbidit na aktivaci destiček.

9 Literatura

Antar SA, Ashour NA, Sharaky M, Khattab M, Ashour NA, Zaid RT, Roh EJ, Elkamhawy A, Al-Karmalawy AA. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. Biomed Pharmacother. 2023;168:115734.

Baumgarten A, Wilhelmi M, Kalbantner K, Ganter M, Mischke R. Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. Vet Clin Pathol. 2010;39(2):149-56.

Bentfeld-Barker, M., Bainton, D. F. Diagram and cross-section illustration of the internal composition of a human platelet [online]. 1982 [cit. 2025-08-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Diagram-and-cross-section-illustration-of-the-internal-composition-of-a-hum

Blockmans D, Deckmyn H, Vermylen J. Platelet activation. Blood Rev. 1995;9(3):143-56.

Brener S, editor. Dual Antiplatelet Therapy for Coronary and Peripheral Arterial Disease. 1st ed. Elsevier Science & Technology; 2021.

Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. Cell Signal. 2004;16(12):1329-44.

Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. J Thromb Haemost. 2014;12(2):126-37.

Carazo A, Hrubša M, Konečný L, Gunaseelan C, Fadraersada J, Skořepa P, Paclíková M, Musil F, Karlíčková J, Javorská L, Matoušová K, Kujovská Krčmová L, Šmahelová A, Blaha V, Mladenka P. Correlations among different platelet aggregation pathways in a group of healthy volunteers. Platelets. 2024;35(1)

Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1800–14.

Cowap N. Diabetes. 1st ed. Rockville, MD: Mercury Learning & Information; 2015.

Cuenca-Zamora EJ, Ferrer-Marín F, Rivera J, Teruel-Montoya R. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters. Int J Mol Sci. 2019;20(14):3484.

Česká diabetologická společnost. Standard: Dietní léčba diabetu mellitus. *Diab.cz* [online]. 2012 Mar [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.diab.cz/wp-content/uploads/2025/03/2012-3-standard_dietni_lecba.pdf

Česká diabetologická společnost. Standardy péče o pacienty s diabetes mellitus – aktualizace 2020 [online]. 2020 [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.diab.cz/wp-content/uploads/2025/03/2020-1-standardy_DM_aktual_2020.pdf

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. Biochemistry. 1991;30(43):10363-70.

DeLoughery TG, editor. Hemostasis and Thrombosis. 4th ed. Springer International Publishing AG; 2019.

DeMarsilis A, Reddy N, Boutari C, Filippaios A, Sternthal E, Katsiki N, Mantzoros C. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update and future directions. Metabolism. 2022;137:155332.

Dittmar S, Polanowska-Grabowska R, Gear ARL. Platelet adhesion to collagen under flow conditions in diabetes mellitus. Thromb Res. 1994;74(3):273-83.

Duttaroy AK. Nutraceuticals and Human Blood Platelet Function: Applications in Cardiovascular Health. Newark: John Wiley & Sons, Incorporated; 2018.

Dwivedi R, Pomin VH. Marine Antithrombotics. Mar Drugs. 2020;18(10):514.

Egan AM, Dinneen SF. What is diabetes? Medicine (Baltimore). 2019;47(1):1-4.

Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract. 2004;65(1):1-8.

Fialová D, Vlček J, kolektiv. Klinická farmacie I. 1. vyd. Praha: Grada; 2009.

Fountain JH, Lappin SL. Platelet. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470328/

Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. Blood. 2015;126(5):582-8.

Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Int J Mol Sci. 2020;21(17):6275.

Gerrard JM, White JG, Peterson DA. The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. Thromb Haemost. 1978;40(2):224-31.

Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. ScientificWorldJournal. 2014;2014:781857.

Glenn JR, Spangenberg P, Heptinstall S. Actin polymerization and depolymerization in relation to platelet shape change, aggregation and disaggregation. Platelets. 1996;7(1-2):23-27.

González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and oxidative stress: An integral, updated and critical overview of their metabolic interconnections. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9352

Gralnick HR, Williams SB, McKeown LP, Magruder L, Hansmann K, Vail M, et al. Platelet von Willebrand factor. Mayo Clin Proc. 1991;66(6):634-40.

Gremmel T, Frelinger AL III, Michelson AD. Platelet physiology. Semin Thromb Hemost. 2016;42(3):191-204.

Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, editors. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update. 1st ed. Cham: Springer; 2017.

Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, editors. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update. 1st ed. Springer; 2017.

Haluzík M, Vrablík M. Přínosy léčby agonisty GLP-1 receptorů pro pacienty s kardiovaskulárním onemocněním. AtheroRev [online]. 2022;7(2):87-92. Dostupné z: https://www.prolekare.cz/casopisy/athero-review/2022-2-22/prinosy-lecby-agonisty-glp1-receptoru-pro-pacienty-s-kardiovaskularnim-onemocnenim-131278/

Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe-Meyer N, Görlinger K. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). Eur J Med Res. 2010;15(5):214-9.

Hashemzadeh M, Haseefa F, Peyton L, Shadmehr M, Niyas AM, Patel A, et al. A comprehensive review of the ten main platelet receptors involved in platelet activity and cardiovascular disease. Am J Blood Res. 2023;13(6):168-188.

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. Blood Rev. 2015;29(1):17-24.

Chottová Dvořáková M, Mistrová E. Fyziologie Krve a Základy Imunity. Prague: Karolinum Press; 2018.

International Diabetes Federation. The Diabetes Atlas [online]. Brussels: International Diabetes Federation; [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://diabetesatlas.org/

Iqbal AM, Lopez RA, Hai O. Antiplatelet medications. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537062/

Jagroop A, Mikhailidis DP. Platelets and diabetes: a complex association. Platelets. 2015;26(3):267-8.

Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. Int J Endocrinol. 2011;2011:742719.

Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J*. 2013;37(6):423-428.

Kleppe R, Jonassen I, Døskeland SO, Selheim F. Mathematical Modelling of Nitric Oxide/Cyclic GMP/Cyclic AMP Signalling in Platelets. Int J Mol Sci. 2018;19(2):612.

Korniluk A, Koper-Lenkiewicz OM, Kamińska J, Kemona H, Dymicka-Piekarska V. Mean Platelet Volume (MPV): New Perspectives for an Old Marker in the Course and Prognosis of Inflammatory Conditions. Mediators Inflamm. 2019;2019:9213074.

Křížková V, Šigutová P, Holubová M, Štambachová A, Dolejšová M, Lysák D, et al. Blood and Blood Components: Hematopoiesis, Selected Methods Used in Cytology, Histology, and Hematology. 1st ed. Praha: Karolinum; 2021.

Kvasnička T. Antiagregancia v ordinaci praktického lékaře. MT - Medical Tribune. 2024 Mar 28. Dostupné z: https://www.tribune.cz/archiv/antiagregancia-v-ordinaci-praktickeho-lekare/

Langelier R, editor. Platelets: Overview, Function and Disorders. New York: Nova Science Publishers, Incorporated; 2019.

Lascar N, Brown J, Pattison H, Barnett AH, Bailey CJ, Bellary S. Type 2 diabetes in adolescents and young adults. Lancet Diabetes Endocrinol. 2018;6(1):69-80.

Li Y, Anand-Srivastava MB. Role of Gi proteins in the regulation of blood pressure and vascular remodeling. Biochem Pharmacol. 2023;208:115384.

Liu B, Wu D. Analysis of G protein-mediated activation of phospholipase C in cultured cells. Methods Mol Biol.2004;237:99-102.

Lovejoy JC. The influence of dietary fat on insulin resistance. Curr Diab Rep. 2002;2(5):435-40.

Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, Mikolajczyk TP. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. J Physiol Pharmacol. 2019;70(6).

Lufkin EG, Fass DN, O'Fallon WM, Bowie EJW. Increased von Willebrand factor in diabetes mellitus. Metabolism. 1979;28(1):63-6.

Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. J Cell Biol.2013;201(6):785-96.

Michelson AD. Platelets. 2nd ed. Elsevier Science; 2011.

Morita I, Takahashi R, Ito H, Orimo H, Murota S. Increased arachidonic acid content in platelet phospholipids from diabetic patients. Prostaglandins Leukot Med. 1983;11(1):33-41.

Nagy Jr B, Bhavaraju K, Getz T, Bynagari YS, Kim S, Kunapuli SP. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform. Blood. 2009;113(11):2557-67.

Národní zdravotnický informační portál (NZIP). Epidemiologie diabetes mellitus: datový souhrn [online]. Praha: NZIP; [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.nzip.cz/data/1769-diabetes-mellitus-epidemiologie-datovy-souhrn

Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. Cell Tissue Res. 2022;387(3):391-398.

Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRγ chain. J Biol Chem. 2000;275(31):23998-4002.

Paclíková M, Konečný L, Carazo A, Matoušová K, Kujovská Krčmová L, Blaha V, Šmahelová A, Mladěnka P. Acetylsalicylic acid and vorapaxar are less active, while 4-methylcatechol is

more active, in type 1 diabetic patients compared to healthy controls. Cardiovasc Diabetol. 2025;24:323

Penka M, Tesařová E, editoři. Hematologie a transfuzní lékařství I. 1. vyd. Praha: Grada; 2011.

Perušičová J, Šmahelová A. Chronické komplikace u diabetes mellitus (1. část). Interní medicína pro praxi. 2001;1(1):34-38. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2001/01/10.pdf

Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb–IIIa complex. Blood. 1988;71(4):831-43.

Piťhová P. Akutní komplikace diabetes mellitus. Interní medicína pro praxi. 2006;12(12):523-525. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2006/12/02.pdf

Poole RM, Elkinson S. Vorapaxar: first global approval. Drugs. 2014;74(10):1153-63.

Poul H. Protidestičková terapie. Klin Farmakol Farm. 2012;26(2):79-83. Dostupné z: https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/02/06.pdf

Rao GH. Physiology of blood platelet activation. Indian J Physiol Pharmacol. 1993;37(4):263-75.

Reilly TP, Fitzgerald GA. Cellular activation by thromboxane A2 and other eicosanoids. Eur Heart J. 1993;14 Suppl I:12-8. PMID: 8131796.

Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Pflügers Arch Eur J Physiol. 2007;454(3):345-59.

Reusswig F, An O, Deppermann C. Platelet life cycle during aging: function, production and clearance. Platelets. 2024;35(1):2433750.

Ribes A, Garcia C, Gratacap MP, et al. Platelet $P2Y_1$ receptor exhibits constitutive G protein signaling and β-arrestin 2 recruitment. BMC Biol. 2023;21(1):14.

Ried-Larsen M, Johansen MY, MacDonald CS, Hansen KB, Christensen R, Wedell-Neergaard AS, et al. Type 2 diabetes remission 1 year after an intensive lifestyle intervention: A secondary analysis of a randomized clinical trial. Diabetes Obes Metab. 2019;21(10):2257-66.

Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. Haematologica. 2009;94(5):700-11.

Roberts DE, McNicol A, Bose R. Mechanism of collagen activation in human platelets. J Biol Chem. 2004;279(19):19421-30.

Roche Diagnostics. Multiplate® analyzer [online]. 2025 [cit. 2025-07-11]. Dostupné z: https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/multiplate-5-analyzer-ins-3691.html

Rucker D, Dhamoon AS. Physiology, Thromboxane A2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. [cit. 2025-08-21]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. Circ Res. 2007;100(12):1673-1685.

Rybka J. Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění. Praha: Grada Publishing; 2007.

Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin. Platelet receptors: an instrumental of platelet physiology. Pak J Med Sci. 2013;29(3):891-896.

Sağcan A, Nalbantgil S, Omay SB, Akin M. The effect of type II diabetes mellitus on platelet aggregation in patients who underwent percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis.* 2002;13(1):45–48.

Sampat PJ, Wadhwa R. Prasugrel. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025. [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557427/

Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. Blood Rev. 2021;46:100733.
Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB. Platelet aggregation pathway. Pharmacogenet Genomics. 2011;21(8):516-21.

Saudek F. Diabetická neuropatie – poškození nervů. Cukrovka.cz [online]. 2020 Aug 20 [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.cukrovka.cz/diabeticka-neuropatie-poskozeni-nervu

Singam NSV, AlAdili B, Amraotkar AR, Coulter AR, Singh A, Kulkarni S, Mitra R, Daham ON, Smith AE, DeFilippis AP. In-vivo platelet activation and aggregation during and after acute atherothrombotic myocardial infarction in patients with and without Type-2 diabetes mellitus treated with ticagrelor. Vascul Pharmacol. 2022;145:107000.

Sinnaeve PR, Adriaenssens T. Dual Antiplatelet Therapy De-escalation Strategies. Am J Cardiol. 2021;144 Suppl 1:S23-S31.

Stanger L, Yamaguchi A, Holinstat M. Antiplatelet strategies: past, present, and future. J Thromb Haemost. 2023;21(12):3317-3328.

Státní zdravotní ústav (SZÚ). Diabetes mellitus [online]. Praha: Státní zdravotní ústav; [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://szu.gov.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/nemoci-a-jejich-prevence/neinfekcni-nemoci/diabetes/

Świderska E, Strycharz J, Wróblewski A, Szemraj J, Drzewoski J, Śliwińska A. Role of PI3K/AKT pathway in insulin-mediated glucose uptake. In: Bagchi D, Das DK, editors. *Molecular Aspects of Metabolic Syndrome* [Internet]. London: IntechOpen; 2018 [cited 2025-07-10]. Dostupné z: https://doi.org/10.5772/intechopen.80402

Škrha J. Chronické komplikace diabetu. Medical Tribune. 2007 Apr 16 [cit. 2025-07-10]. Dostupné z: https://www.tribune.cz/archiv/chronicke-komplikace-diabetu/

Švihovec J, editor. Farmakologie. 1. vyd. Praha: Grada; 2018.

Tang WH, Stitham J, Gleim S, Di Febbo C, Porreca E, Fava C, Tacconelli S, Capone M, Evangelista V, Levantesi G, Wen L, Martin K, Minuz P, Rade J, Patrignani P, Hwa J. Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4462–4476.

Tasdemir E, Toptas T, Demir C, Esen R, Atmaca M. Aspirin resistance in patients with type II diabetes mellitus. *Ups J Med Sci.* 2014;119(1):25-31.

Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Tsioufis K, Tousoulis D. Factors associated with platelet activation – recent pharmaceutical approaches. Int J Mol Sci. 2022;23(6):3301.

Tonin G, Klen J. Eptifibatide, an Older Therapeutic Peptide with New Indications: From Clinical Pharmacology to Everyday Clinical Practice. Int J Mol Sci. 2023;24(6):5446.

Twomey L, Wallace RG, Cummins PM, Degryse B, Sheridan S, Harrison M, et al. Platelets: From Formation to Function. In: IntechOpen [Internet]. 2018 Dec 29 [cit. 2025-07-09]. Dostupné z: https://doi.org/10.5772/intechopen.80924

Weisel JW. Fibrinogen and fibrin. Adv Protein Chem. 2005;70:247-99.

World Health Organization (WHO). Diabetes [online]. Updated 14 November 2024 [cit. 2025-07-10]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes

Woulfe DS. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. J Thromb Haemost. 2005;3(10):2193-200.

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*. 2001;50(6):1491–1494.

Yao H, Zhang A, Li D, Wu Y, Wang CZ, Wan JY, Yuan CS. Comparative effectiveness of GLP-1 receptor agonists on glycaemic control, body weight, and lipid profile for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis. BMJ. 2024;384:e076410.

Yu M, Cantor AB. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis: an update on cytokines and lineage surface markers. Methods Mol Biol. 2012;788:291-303.

Zeibi Shirejini S, Carberry J, Alt K, Gregory SD, Hagemeyer CE. Shear-Responsive Drug Delivery Systems in Medical Devices: Focus on Thrombosis and Bleeding. Adv Funct Mater. 2023;33(25):2303717.

Zhou AM, Xiang YJ, Liu EQ, Cai CH, Wu YH, Yang LB, Zeng CL. Salvianolic acid A inhibits platelet activation and aggregation in patients with type 2 diabetes mellitus. BMC Cardiovasc Disord. 2020;20(1):15.

Zufferey A, Fontana P, Reny JL, Nolli S, Sanchez JC. Platelet proteomics. Mass Spectrom Rev. 2012 ;31(2):331-51.