



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Analityki Medycznej

ROZPRAWA DOKTORSKA

Alina Rak-Pasikowska

**Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej
i zanieczyszczeń leukocyтарnych w procesie aktywacji płytek
krwi w preparatach przeznaczonych do transfuzji**

Matrix metalloproteinases and leukocyte contamination significance in the
process of platelet activation in concentrates intended for transfusion

Promotor:

Dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni

Wrocław 2023

I. Streszczenie

Wprowadzenie: Transfuzje koncentratów krwinek płytkowych (KKP) często stanowią procedury ratujące życie. Maksymalny czas przechowywania KKP wynosi od 5 do 7 dni. Podczas przechowywania KKP spada ich jakość, a płytki krwi tracą swoje funkcje. Szereg tych niekorzystnych zmian określa się jako uszkodzenia płytek krwi związane z przechowywaniem – PSL (ang. *platelet storage lesions*). Przyczyny tych zmian nie zostały do końca poznane.

Cele badań: Zbadanie, czy obecność leukocytów oraz metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) prowadzi do obniżenia jakości koncentratów krwinek płytkowych (KKP) i czy jest przyczyną zmian w reaktywności i aktywacji płytek. Ponadto sprawdzenie, czy istnieje możliwość spowolnienia starzenia się płytek krwi w trakcie ich przechowywania poprzez farmakologiczne hamowanie aktywności MMP w KKP. Poza tym zbadanie, czy w trakcie przechowywania KKP dochodzi do zmian stężenia i aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz ekspresji ich genów w płytkach krwi

Materiały i metody: Analizie poddano dziewięć KKP, każdy utworzono z pięciu kożuszków leukocytarno-płytkowych. Każdy z KKP podzielono na trzy części: 1) nie poddawano dodatkowym procedurom (NF); 2) poddano filtracji w celu usunięcia leukocytów (F); 3) dodano inhibitor metaloproteinaz – doksycyklinę (stężenie końcowe 10 μ M) (D). Każdy KKP przechowywano w standardowych warunkach przez 144 h, oddzielając próbki badane w dniu przygotowania (0 h przechowywania) oraz po 24, 48, 72 i 144 h przechowywania. W KKP przeprowadzono analizę morfologiczną (liczba PLT, MPV, PDW, P-LCR), oceniono agregację płytek krwi pod wpływem ADP, kolagenu, epinefryny i kwasu arachidonowego. W analizie cytofluorymetrycznej oceniono ekspresję markerów aktywacji – P-selektynę, zaktywowaną formę GPIIb/IIIa (wiązaną PAC-1), CD63 oraz eksternalizację fosfatydyloseryny (wiązaną aneksyną V). W wyizolowanych płytkach krwi oraz nadsączach stanowiących medium, w którym zawieszono były płytki podczas przechowywania oceniono stężenie (testy ELISA) i aktywność (zymografia żelatynowa) MMP-2 oraz MMP-9. W wyizolowanych płytkach krwi oceniono ekspresję mRNA *MMP-2* i *MMP-9*.

Wyniki: W trakcie przechowywania nie zaobserwowano zmniejszenia się liczby płytek. Stwierdzono natomiast wzrost MPV, PDW i P-LCR w koncentraty poddanych filtracji. Podczas przechowywania zaobserwowano postępującą redukcję agregacji płytek krwi pod wpływem każdego stosowanego agonisty. Ekspresja PAC-1, CD63 oraz P-selektyny ulegała wzrostowi podczas przechowywania. Nie zaobserwowano wpływu przechowywania na wiązanie aneksyny V. Koncentraty z dodatkiem doksycykliny charakteryzowały się najniższym

poziomem ekspresji markerów aktywacji płytek krwi po 144 h przechowywania. Z kolei KKP filtrowane charakteryzowały się na ogół najwyższym poziomem aktywacji. W trakcie przechowywania nie stwierdzono różnic w aktywności MMP-2 w płytkach krwi pomiędzy różnymi rodzajami KKP, ale zaobserwowano zmniejszenie aktywności wraz z czasem przechowywania koncentratów. Aktywność MMP-9 w płytkach krwi była wyższa w koncentratkach niefiltrowanych po 72 h (NF vs F $p = 0,01$, D vs F $p = 0,01$) oraz po 144 h przechowywania (NF vs F $p = 0,038$). Po 144 h stwierdzono wyższe stężenie MMP-2 w nadsączach koncentratów niefiltrowanych (D oraz NF vs F, $p < 0,01$). Zaobserwowano wzrost ekspresji genu *MMP-2* podczas przechowywania we wszystkich rodzajach KKP, natomiast ekspresja genu *MMP-9* wzrastała wyłącznie w preparatach zawierających leukocyty. W trakcie przechowywania stwierdzono różnice pomiędzy ekspresją obydwu genów pomiędzy różnymi rodzajami KKP – w koncentratkach filtrowanych ekspresja ta była na najniższym poziomie. Stwierdzono wzrost aktywności MMP wraz ze wzrostem liczby leukocytów. Zaobserwowano, że w nadsączach koncentratów zawierających leukocyty stężenia MMP-2 i MMP-9 wykazują umiarkowaną, dodatnią korelację z ekspresją aktywnej formy GPIIb/IIIa – jednego z podstawowych markerów aktywacji.

Wnioski: Proces filtracji, jak również dodatek inhibitora MMP w postaci doksycykliny (stęż. końcowe 10 μM) nie wpływa na zmianę liczby płytek krwi podczas przechowywania KKP, jednak prowadzi do wyższego stopnia aktywacji płytek krwi, co sprzyja pojawianiu się agregatów płytkowych pod koniec przechowywania KKP. Podczas przechowywania KKP dochodzi do stopniowej aktywacji płytek krwi i obniżenia zdolności płytek do agregacji. Wraz ze wzrostem liczby leukocytów w KKP wzrasta aktywność MMP, dlatego leukocyty mogą stanowić potencjalne źródło metaloproteinaz w koncentratkach. Zwiększone stężenie metaloproteinaz w KKP niepodlegających filtracji wiąże się z wyższą ekspresją aktywnej formy GPIIb/IIIa, która jest podstawowym markerem aktywacji płytek krwi. Obecność doksycykliny w KKP obniża ekspresję markerów aktywacji w porównaniu do koncentratów filtrowanych, co potencjalnie może zwiększyć efektywność transfuzji.

II. Summary

Introduction: Transfusions of platelet concentrates (PC) are often life-saving procedures. The maximum storage time of the PC ranges from 5 to 7 days. During storage, the PCs quality decrease and platelets lose their functions. A number of these unfavorable changes are referred to as platelet storage lesions (PSL). The reasons for these changes are not fully understood yet.

Aim of the study: Evaluation whether the presence of leukocytes and matrix metalloproteinases (MMP) leads to a decrease in the quality of platelet concentrates and whether it is the cause of changes in platelet reactivity and activation. In addition, examination whether there is a possibility to slow down the aging of platelets during their storage by pharmacologically inhibiting the activity of MMPs in PC. Moreover, assessment if concentration and activity of the MMP-2 and the MMP-9, and the expression of their genes in blood platelets changes during the PC storage.

Materials and methods: Nine PC, prepared from five buffy coats each, were analyzed. Each PC was divided into three parts: 1) no additional procedures were performed (NF); 2) leukocyte-depleted (F); 3) a metalloproteinase inhibitor – doxycycline (final concentration 10 μ M) was added (D). Each PC was stored under standard conditions for 144 h, separating the samples tested on the day of preparation (0 h of storage) and after 24, 48, 72 and 144 h of storage. Morphological analysis (PLT number, MPV, PDW, P-LCR) was performed. Platelet aggregation induced by ADP, collagen, epinephrine and arachidonic acid was assessed. In the cytofluorimetric analysis, the expression of activation markers – P-selectin, activated form of GPIIb/IIIa (PAC-1 binding), CD63, and externalization of phosphatidylserine (annexin V binding) were evaluated. The MMP-2 and MMP-9 concentration (ELISA tests) and activity (gelatin zymography) were assessed in the isolated platelets and supernatants (the medium in which the platelets were suspended during storage). *MMP-2* and *MMP-9* mRNA expression was assessed in isolated platelets.

Results: No decrease in platelet count was observed during storage. However, an increase in MPV, PDW and P-LCR was found in the leukocyte-depleted concentrates. A progressive decrease in platelet aggregation induced by each used agonists was observed during storage. PAC-1, CD63, and P-selectin expression increased during storage. No effect of storage on annexin V binding was observed. Concentrates with the addition of doxycycline were characterized by the lowest level of expression of platelet activation markers after 144 h of storage. In turn, leukocyte-depleted PC were characterized by the highest level of platelets activation generally. There were no differences in MMP-2 activity in platelets between different

types of PC during storage, however, a decrease in activity was observed with the time of concentrates' storage. MMP-9 activity in platelets was higher in unfiltered concentrates after 72 h (NF vs F $p = 0.01$, D vs F $p = 0.01$) and after 144 h of storage (NF vs F $p = 0.038$). After 144 h, a higher concentration of MMP-2 was found in the supernatants of unfiltered concentrates (D and NF vs F, $p < 0.01$). An increase in the expression of the *MMP-2* gene was observed during storage in all types of PC, while the expression of the *MMP-9* gene was increased only in PC containing leukocytes. During storage, differences in the expression of both genes between different types of PC were found – the expression was at the lowest in the leukocyte-depleted PC. Correlation of an increase in MMP activity with an increase in the leukocytes number was found. The moderate positive correlation of MMP-2 and MMP-9 concentrations in supernatants with the expression of the active form of GPIIb/IIIa (one of the basic activation markers) in the concentrates containing leukocytes (NF and D) was observed.

Conclusions: The filtration process, as well as the MMP inhibitor addition (doxycycline; final concentration 10 μM) does not affect the change in the number of platelets during storage of PC. The filtration leads to a higher level of platelet activation, which favors the platelet aggregates formation at the end of PC storage. Platelets are gradually activated and their aggregation ability is reduced during PC storage. The increase in the leukocytes number correlate with the higher MMP activity, therefore leukocytes may be a potential source of metalloproteinases in concentrates. Increased concentration of metalloproteinases in unfiltered PC is associated with higher expression of the active form of GPIIb/IIIa, which is the basic platelet activation marker. The presence of doxycycline in PC reduces the expression of activation markers compared to leukocyte-depleted concentrates, which may potentially increase the efficiency of transfusion.