



**UNIwersytet Medyczny**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Wydział Farmaceutyczny**  
Katedra Analityki Medycznej

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

Kornela Hałucha

**Wpływ płytek krwi i mikrocząsteczek pochodzenia  
płytkowego na uszkodzenie kardiomiocytów w warunkach  
chemicznego niedokrwienia i reperfuzji**

The influence of platelets and platelet-derived microparticles on the injury  
of cardiomyocytes under chemical ischemia and reperfusion conditions

Promotor

**dr hab. n. farm. Iwona Bil-Lula, prof. uczelni**

Wrocław 2024

## ***Podziękowania***

*Przede wszystkim dziękuję mojej Rodzinie. Dziękuję za pomoc, wiarę we mnie i wsparcie podczas powstawania tej pracy.*

*Chciałabym podziękować Profesor Iwonie Bil-Luli za wsparcie, poświęcony czas i pomoc podczas powstawania niniejszej rozprawy.*

*Serdeczne podziękowania należą się dr Alinie Rak-Pasikowskiej, dr Agnieszce Sapie-Wojciechowskiej oraz dr Agnieszce Olejnik za pomoc w rozbudowywaniu warsztatu badawczego, wszelkie sugestie merytoryczne oraz podnoszenie na duchu w chwilach zwątpienia.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom Katedry Analityki Medycznej za pracę w atmosferze wzajemnego zrozumienia.*

*Współpracownikom z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej DCOPIH dziękuję za entuzjazm i wsparcie w trudnych momentach.*

## Spis treści

<b>I. WSTĘP .....</b>	<b>8</b>
1. PŁYTKI KRWI.....	8
1.1. Budowa płytek krwi.....	8
2. ZAWAŁ I USZKODZENIE NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNE MIĘŚNIA SERCOWEGO.....	13
2.1. Patofizjologia zawału mięśnia sercowego .....	13
2.2. Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne mięśnia sercowego.....	14
3. ZNACZENIE PŁYTEK KRWI W MI I USZKODZENIU NIEDOKRWIENNO- REPERFUZYJNYM SERCA.....	18
3.1. Protekcyjna rola płytek krwi w MI .....	21
4. MIKROCZĄSTECZKI POCHODZENIA PŁYTKOWEGO .....	26
5. METALOPROTEINAZY MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ (MMP) ....	28
5.1. Budowa MMP.....	28
5.2. Aktywacja MMP.....	30
5.3. Funkcje MMP .....	31
5.4. Metaloproteiny płytek krwi.....	31
5.5. Rola metaloproteinaz w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca .....	33
6. CEL PRACY.....	37
<b>II. MATERIAŁ I METODY.....</b>	<b>39</b>
1. Materiał.....	39
2. Metody.....	39
2.1. Izolacja płytek krwi .....	39
2.2. Hodowla komórkowa.....	41
2.3. Procedura chemicznego niedokrwienia i reperfuzji (I/R).....	44

2.4. Barwienie FDA/DAPI.....	48
2.5. Immunofluorescencja.....	50
2.6. Badanie cytometryczne płytek krwi .....	52
2.7. Badanie cytometryczne mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego .....	54
2.8. Trypsynizacja komórek HCM z płytek 12-dołkowych.....	55
2.9. Homogenizacja .....	56
2.10. Zymografia żelatynowa .....	58
2.11. Oznaczanie białka metodą Bradforda .....	61
2.12. Izolacja RNA z płytek krwi i kardiomiocytów .....	62
2.13. Odwrotna transkrypcja.....	63
2.14. Real-time PCR .....	64
2.15. ELISA MMP-2 .....	66
2.16. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH).....	67
2.17. Analiza statystyczna .....	69
<b>III. WYNIKI.....</b>	<b>71</b>
1. CYTOMETRYCZNA OCENA AKTYWACJI PŁYTEK KRWI W GRUPIE BADANEJ .....	71
1.1. Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia.....	71
1.2. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia.....	71
1.3. Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia .....	72
1.4. Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji.....	73
1.5. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji .....	75

1.6. Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji .....	77
1.7. Badanie cytometryczne PMP .....	79
<b>2. AKTYWNOŚĆ METALOPROTEINAZ MACIERZY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ W HOMOGENATACH KOMÓRKOWYCH .....</b>	
2.1. Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach niepoddanych interakcji z płytkami krwi .....	81
2.2. Aktywność MMP-2 w kardiomiocytach niepoddanych interakcji z płytkami krwi.....	82
2.3. Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach niepoddanych interakcji z płytkami krwi.....	83
2.4. Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi.....	84
2.5. Aktywność MMP-2 w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi.....	85
2.6. Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi.....	86
2.7. Aktywność proMMP-2 w płytkach krwi po I/R .....	87
2.8. Aktywność MMP-2 w płytkach krwi po I/R .....	88
2.9. Aktywność MMP-9 w płytkach krwi po I/R .....	89
2.10. Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 kardiomiocytów .....	91
2.11. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-2 w kardiomiocytach .....	92
2.12. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 kardiomiocytów.....	93
<b>3. UWALNIANIE I AKTYWNOŚĆ MMP W PRZESTRZENI POZAKOMÓRKOWEJ PO ETAPIE NIEDOKRWIENIA .....</b>	
3.1. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej .....	94
3.2. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej.....	95
3.3. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej.....	95

3.4. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej .....	96
3.5. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej.....	97
3.6. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej.....	97
3.7. Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia .....	98
3.8. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia.....	100
4. UWALNIANIE I AKTYWNOŚĆ MMP W PRZESTRZENI POZAKOMÓRKOWEJ PO ETAPIE REPERFUZJI.....	101
4.1. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej .....	101
4.2. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej.....	102
4.3. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej.....	102
4.4. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej .....	104
4.5. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej.....	106
4.6. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej.....	106
4.7. Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji .....	108
4.8. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji.....	109
5. STĘŻENIE MMP-2 W PŁYTKACH KRWI W GRUPIE BADANEJ .....	111
6. PCR.....	112
6.1. Ekspresja genu <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach w grupie kontrolnej .....	112
6.2. Ekspresja genu <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach w grupie kontrolnej .....	113
6.3. Ekspresja genu <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach w grupie badanej .....	113
6.4. Ekspresja genu <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach w grupie badanej .....	114

6.5. Ekspresja genu <i>MMP-2</i> w płytkach krwi w grupie badanej .....	115
6.6. Ekspresja genu <i>MMP-9</i> w płytkach krwi w grupie badanej .....	116
6.7. Analiza wpływu płytek krwi na zmiany ekspresji genu <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach.....	117
6.8. Analiza wpływu płytek krwi na zmiany ekspresji genu <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach.....	118
7. AKTYWNOŚĆ LDH.....	120
7.1. Aktywność LDH po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej .....	120
7.2. Aktywność LDH po etapie niedokrwienia w grupie badanej .....	120
7.3. Wpływ płytek krwi na aktywność LDH .....	121
8. STĘŻENIE BIAŁKA CAŁKOWITEGO W HOMOGENATACH KOMÓRKOWYCH.....	123
8.1. Stężenie białka w kardiomiocytach w grupie kontrolnej.....	123
8.2. Stężenie białka w kardiomiocytach w grupie badanej.....	123
8.3. Stężenie białka w płytkach krwi w grupie badanej.....	124
9. OCENA AKTYWNOŚCI METABOLICZNEJ KARDIOMIOCYTÓW .....	126
9.1. Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w grupie kontrolnej .....	126
9.2. Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w grupie badanej .....	126
9.3. Wpływ płytek krwi na aktywność metaboliczną kardiomiocytów .....	127
10. EKSPRESJA BIAŁKA iNOS W KARDIOMIOCYTACH.....	130
10.1. Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach grupy kontrolnej .....	130
10.2. Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej.....	130
10.3. Wpływ płytek krwi na ekspresję białka iNOS w kardiomiocytach.....	131
11. ZWIĄZEK PMP Z BADANYMI PARAMETRAMI KARDIOMIOCYTÓW .....	134

12. ZALEŻNOŚCI AKTYWNOŚCI, STĘŻENIA I EKSPRESJI GENÓW MMP-2 I MMP-9 POMIĘDZY PŁYTKAMI KRWI A KARDIOMIOCYTAMI .....	136
<b>IV. DYSKUSJA .....</b>	<b>147</b>
<b>V. WNIOSKI .....</b>	<b>162</b>
<b>VI. Spis wykresów.....</b>	<b>163</b>
<b>VII. Spis tabel.....</b>	<b>167</b>
<b>VIII. Spis rycin.....</b>	<b>168</b>
<b>IX. Streszczenie .....</b>	<b>170</b>
<b>X. Summary.....</b>	<b>172</b>
<b>XI. Wykaz stosowanych skrótów.....</b>	<b>174</b>
<b>XII. Bibliografia.....</b>	<b>178</b>
<b>SUPLEMENT.....</b>	<b>202</b>



# I. WSTĘP

## 1. Płytki krwi

Płytki krwi (trombocyty) to elementy morfotyczne krwi o średnicy 2–4  $\mu\text{m}$ , pozbawione jądra komórkowego, powstające jako końcowy etap dojrzewania megakariocytów. W liczbie  $150\text{--}400 \times 10^9/\text{l}$  żyją w krwioobiegu od 7 do 10 dni, po czym ulegają sekwestracji w śledzionie. W procesie dojrzewania megakariocytów dochodzi do różnicowania, dojrzewania i fragmentacji ich cytoplazmy oraz tworzenia proplatek, z których następnie powstają płytki krwi <sup>1</sup>. Choć płytki nie posiadają jądra komórkowego, rozwinięły szereg elementów strukturalnych, w tym cytoskielet, posiadają receptory błonowe oraz liczne organelle, w tym ziarnistości gęste oraz alfa ( $\alpha$ ), peroksyomy, lizosomy i mitochondria. Budowa płytek krwi sprawia, że płytki wykazują aktywny metabolizm i wysoką reaktywność <sup>1,2</sup>. Oprócz powszechnie znanej roli płytek krwi w procesach hemostazy, aktywowane płytki pełnią funkcję m.in. w leczeniu ran, progresji nowotworów, stanach zapalnych, procesach immunologicznych, a zaburzenia ilościowe i jakościowe płytek krwi prowadzą do wielu stanów patologicznych <sup>1,2</sup>.

### 1.1. Budowa płytek krwi

#### 1.1.1. Błona plazmatyczna

Błona plazmatyczna płytek krwi zbudowana jest z podwójnej warstwy fosfolipidów, w której osadzony jest cholesterol, glikolipidy i glikoproteiny (GP) <sup>1</sup>. Błona z zewnątrz pokryta jest glikokaliksem, który zawiera zewnętrzne końce błonowych GP, glikolipidy i zaadsorbowane białka osocza <sup>3</sup>. Ujemny ładunek elektryczny glikokaliks zawdzięcza resztom kwasu sialowego i lipidom. Glikokaliks zapobiega przyleganiu płytek krwi do siebie i innych komórek. W mikroskopii elektronowej o wysokiej rozdzielczości glikokaliks charakteryzuje pomarszczony wygląd, z wieloma drobnymi fałdami i przypadkowo rozmieszczonymi otworami układu otwartych kanalików (ang. *open canalicular system*, OCS) <sup>3,4</sup>. W błonie plazmatycznej zakotwiczone są pompy adenozylo-5'-trifosforanowo (ATP)-zależne: sodowa i potasowa, które kontrolują wewnątrzkomórkowe środowisko jonowe płytek krwi. Umiejscowienie fosfolipidów w błonie plazmatycznej płytek cechuje asymetria. W wewnętrznej warstwie błony komórkowej ekspresjonowane są ujemnie naładowane fosfolipidy (fosfatydyloseryna i fosfatydyloinozytol), które utrzymują powierzchnię płytek krwi w stanie

nieprokoagulacyjnym<sup>1</sup>. Natomiast w warstwie zewnętrznej błony komórkowej dominują obojętne lipidy cholinowe, takie jak fosfatydylocholina i sfingomielina. Ponadto dwuwarstwa lipidowa zawiera czynnik tkankowy (ang. *tissue factor*, TF), eksponowany na powierzchni płytek krwi w postaci nieaktywnej. Aktywacja płytek prowadzi do uwolnienia mikrocząstek pochodzenia płytkowego (ang. *platelet-derived microparticles*, PMP), zawierających TF i zdolnych do wiązania czynników krzepnięcia (Va, VIIa, i Xa) do powierzchniowej fosfatydyloseryny. Interakcja TF i czynników krzepnięcia prowadzi do zwiększonego wytwarzania trombiny na powierzchni aktywowanych płytek krwi oraz PMP<sup>3,5</sup>. Błona plazmatyczna zawiera także powierzchniowe GP, które biorą udział w interakcji płytek krwi ze strukturami podśródbłonkowymi uszkodzonej ściany naczynia, następnej aktywacji, adhezji i agregacji płytek krwi oraz retrakcji skrzepu<sup>3,4</sup>. Obszar podbłonowy płytki leży bezpośrednio pod dwuwarstwą lipidową, zawiera mikrofilamenty aktyny i miozyny, które są niezbędne do zmiany kształtu płytek krwi np. podczas ich aktywacji. Obszar podbłonowy bierze udział w regulacji procesów sygnalizacyjnych, wymaganych do aktywacji płytek krwi<sup>3,4,6,7</sup>.

### 1.1.2. Układ błon płytkowych

Oprócz zewnętrznej błony plazmatycznej, układy błon w ludzkich płytkach krwi obejmują: kompleksy Golgiego, OCS, kanaliki o dużej gęstości elektronowej (kanaliki gęste, tzw. zamknięte) i szorstkie retikulum endoplazmatyczne<sup>3</sup>. Pozostałości megakariocytarnych kompleksów Golgiego spotykane są w mniej niż 1% prawidłowych ludzkich płytek krwi, natomiast częściej występują u pacjentów z zaburzeniami hipogranularnymi płytek np. w zespole białych płytek<sup>8,9</sup>.

OCS płytek krwi stanowią liczne wgłębienia błony komórkowej, które rozciągają się do wnętrza płytki krwi<sup>10,11</sup>. OCS bierze udział w uwalnianiu zawartości ziarnistości płytkowych<sup>12</sup> lub w transporcie składników osocza, np. fibrynogenu do ziarnistości  $\alpha$ <sup>3</sup>. OCS może także stanowić rezerwuar błony wewnętrznej, który ułatwia tworzenie filopodiów i rozprzestrzenianie się po adhezji płytek krwi do powierzchni aktywującej. Proces ten powoduje dramatyczny wzrost pola powierzchni błony plazmatycznej w porównaniu z powierzchnią spoczynkowej płytki krwi i może być wspomagany przez fuzję ziarnistości  $\alpha$  i gęstych z błoną plazmatyczną po uwolnieniu zawartości ziarnistości<sup>1</sup>. OCS jest także miejscem przechowywania GP błony komórkowej np.

GP Ib/IX<sup>13</sup>. Układ kanalików gęstych jest pozostałością megakariocytowego retikulum endoplazmatycznego i składa się z kanałów losowo rozproszonych w cytoplazmie płytek krwi. Kanaliki gęste zawierają amorficzną substancję, która w mikroskopie elektronowym przypomina przezroczystość otaczającą cytoplazmę<sup>10</sup>. Kanaliki zamknięte zawierają fosfolipidy, enzymy cyklu przemian kwasu arachidonowego (AA) oraz jony wapnia<sup>3</sup>.

### 1.1.3. Cytoszkielecik płytek krwi

Kurczliwy cytoszkielecik płytkowy warunkuje utrzymanie dyskoidalnego kształtu płytek krwi i jest niezbędny do zmiany kształtu płytek podczas aktywacji. Ponadto cytoszkielecik bierze udział w przemieszczaniu się receptorów i cząstek na powierzchnię płytek<sup>6</sup>. Trzy główne składniki cytoszkielecik to szkielecik błonowy, podbłonowe zwoje mikrotubuli oraz filamety aktynowe, które wypełniają cytoplazmę<sup>1</sup>. Oprócz tych podstawowych struktur, w skład cytoszkielecik wchodzą także białka dodatkowe oraz białka motorowe, do których należy miozyna. Białka dodatkowe wpływają na procesy polimeryzacji mikrotubuli i włókienek lub łączą włókienka między sobą. W kompartmentcie podbłonowym domeny cytoplazmatyczne wszystkich receptorów transbłonowych oddziałują z białkami, z których wiele jest związanych z kalmoduliną, miozyną i włóknami aktynowymi<sup>3,14</sup>. W ten sposób regulują procesy sygnalizacyjne, wymagane do aktywacji płytek krwi. W skład szkielecik błonowego wchodzą: białko wiążące aktynę, spektryna, białko wiążące dystrofinę, talina oraz skelemina. Pasma spektryny łączą się ze sobą poprzez wiązanie długich włókien aktynowych. Ponadto adducyna tworzy triadowy kompleks z aktyną i spektryną, pokrywając końce włókien aktynowych w spoczynkowym cytoszkielecie<sup>15</sup>. Cytoplazma płytek krwi przypomina płynny żel i zawiera losowo zorganizowane mikrotubule i mikrofilamety, rozproszony glikogen oraz organella. Mikrotubule są rozmieszczone w obwodowych zwojach blisko ściany komórkowej, tworząc układ podtrzymujący cytoszkielecik<sup>16,17</sup>. Podczas aktywacji płytek cytoplazmatyczny układ aktyny zwięża cewki mikrotubul, w wyniku czego ziarnistości  $\alpha$  oraz ziarnistości gęste zostają przesunięte do centrum płytki<sup>18</sup> i dochodzi do wydzielania ich zawartości przez OCS<sup>19</sup>.

#### 1.1.4. Organella płytek krwi

Ziarnistości wewnątrzpłytkowe są miejscem magazynowania wielu cząsteczek biologicznie czynnych, które są uwalniane do otaczającego środowiska podczas aktywacji płytek, w miejscu uszkodzenia naczyń, pełniąc rolę w rekrutacji innych komórek krwi do miejsca uszkodzenia. W spoczynkowych płytkach krwi granulki są umieszczone blisko OCS. Podczas aktywacji płytek krwi zawartość ziarnistości wydzielana jest do OCS <sup>20</sup>.

##### *Ziarnistości alfa*

Ziarnistości alfa należą do najliczniej występujących ziarnistości płytek krwi, w ilości około 40–80 na płytkę. Ich średnica wynosi 200–500 nm, mają kulisty kształt z ciemnym centralnym rdzeniem <sup>1,21</sup>. Zawartość ziarnistości alfa pochodzi z endogennej syntezy białek np.  $\beta$ -tromboglobuliny, czynnika płytkowego 4, czynnika von Willebranda, a także z egzogennych białek osocza, pobranych za pośrednictwem endocytozy i pinocytozy <sup>3</sup>. Do białek ziarnistości alfa należą:

- białka swoiste płytek: czynnik płytkowy 4,  $\beta$ -tromboglobulina;
- białka adhezyjne: P-selektyna, fibronektyna, czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*, vWF), trombospondyna, witronektyna;
- białka zaangażowane w krzepnięcie krwi oraz proces fibrynolizy: fibrynogen, czynnik (cz.) V, cz. VIII, wielkocząsteczkowy kininogen, cz. XI, inhibitor C1-esterazy, białko S, inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), t-PA;
- mitogeny: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF), transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ );
- białka błonowe ziarnistości: P-selektyna, białko 33, GP IIb-IIIa (integryna  $\alpha$ IIb $\beta$ 3), GP Ib-IX, GP IV (CD36), GP V, CD9, osteonektyna, Rap Ib <sup>3</sup>.

Po aktywacji płytek białka ziarniste związane z błoną ulegają ekspresji na powierzchni płytek, natomiast rozpuszczalne białka ziarniste są uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej. Ekspresja niektórych białek błonowych np. P-selektyny na powierzchni płytek krwi jest uznawana za marker aktywacji płytek <sup>22–24</sup>. Białka ziarnistości alfa biorą również udział w naprawie naczyń po uszkodzeniu, gdyż zawierają cząsteczki niezbędne do adhezji płytek krwi w miejscu uszkodzenia, takie jak vWF, GP IIb-IIIa. Ponadto zawartość ziarnistości alfa uwolniona w wyniku aktywacji płytek

krwi bierze udział w rekrutacji neutrofilów do miejsca uszkodzenia (przy udziale P-selektyny<sup>25</sup> i w procesie angiogenezy<sup>26</sup>.

### *Ziarnistości gęste*

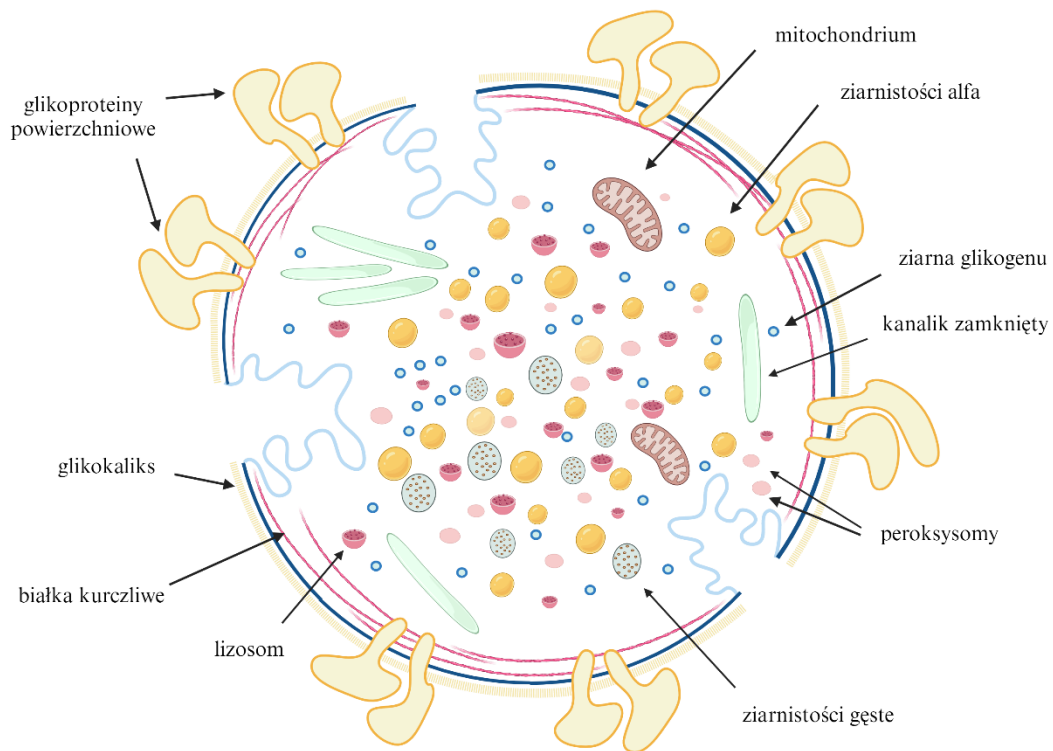
Ziarnistości gęste zawierają guanozyno-5'-difosforan (GDP), guanozyno-5'-trifosforan (GTP), jony wapnia, jony magnezu, jonu potasu, serotoninę oraz fosfoinozytole i polifosforany, a także wysokie stężenia adenozy-no-5'-difosforanu (ADP) i ATP<sup>21</sup>. ATP-zależna pompa protonowa warunkuje kwasowe środowisko ziarnistości gęstych o pH około 5,4<sup>27</sup>. ADP jest słabym agonistą płytek krwi, wywołującym zmianę kształtu płytek, uwalnianie ziarnistości i agregację. Zawartość ziarnistości gęstych bierze udział w rekrutacji dodatkowych płytek krwi do miejsc uszkodzenia naczyń<sup>1</sup>. Wykazano, że serotonina, uwalniana z ziarnistości gęstych, jest niezbędna w procesie regeneracji wątroby<sup>28</sup>.

### *Organella płytek krwi: mitochondria, lizosomy, peroksysomy*

Płytki krwi zawierają niewielką liczbę mitochondriów, jednak ze względu na stosunkowo krótki czas życia płytek krwi (7–10 dni), mitochondria płytkowe zapewniają wystarczające źródło energii dla płytek<sup>1</sup>. W cytoplazmie płytek krwi obecne są także lizosomy i peroksysomy. Lizosomy to małe organella zawierające duży asortyment enzymów degradujących, w tym:

- enzymy degradujące białka: katepsyny, elastaza, kolagenaza, karboksypeptydaza;
- enzymy rozkładające węglowodany: glukozydaza, galaktozydaza, mannozydaza;
- enzymy rozszczepiające estry fosforanowe: kwaśna fosfataza<sup>3</sup>.

Lizosomy degradują głównie materiał pobrany na drodze fagocytozy lub pinocytozy. Natomiast peroksysomy to małe organella zawierające enzym – katalazę.<sup>1</sup> Budowę płytek krwi zilustrowano na rycinie 1.



**Rycina 1. Schemat budowy płytki krwi.**  
 Obraz powstał przy użyciu BioRender.com.

## 2. Zawał i uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne mięśnia sercowego

### 2.1. Patofizjologia zawału mięśnia sercowego

Choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną zachorowalności i śmiertelności na całym świecie<sup>29</sup>. Najczęstszą postacią choroby sercowo-naczyniowej jest zawał mięśnia sercowego (ang. *myocardial infarction*, MI). Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. *European Society of Cardiology*, ESC) w czwartej definicji zawału mięśnia sercowego określiło, że MI definiuje się jako obecne, gdy stężenie troponin sercowych (cTn) we krwi wzrasta powyżej 99 percentyla górnej granicy przedziału referencyjnego (URL). Natomiast klinicznie ostry zawał mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*, AMI) został zdefiniowany jako obecność ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego, wykrytego na podstawie wzrostu lub spadku cTn z co najmniej jedną wartością powyżej 99 percentyla URL, w warunkach ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego<sup>30</sup>. MI to stan spowodowany uszkodzeniem komórek mięśnia sercowego z powodu niedostatecznego przepływu krwi<sup>31</sup>. Zmniejszenie przepływu wieńcowego lub brak pokrycia zapotrzebowania tkanki serca na tlen i substancje odżywcze prowadzi do niedokrwienia mięśnia sercowego. Istotną cechą niedokrwienia jest niewystarczająca

ilość tlenu do utrzymania fosforylacji oksydacyjnej mitochondriów<sup>32</sup>. AMI jest zwykle spowodowany pęknięciem niestabilnej blaszki miażdżycowej i powstaniem skrzepliny blokującej tętnicę. AMI powstaje również w wyniku zabiegów interwencyjnych, takich jak: reperfuzja, angioplastyka, przeszczepienie serca i tromboliza, charakteryzujące się nagłym zmniejszeniem przepływu krwi do mięśnia sercowego, co ostatecznie może prowadzić do niewydolności serca i śmierci<sup>33</sup>.

Pozbawienie mięśnia sercowego tlenu i składników odżywczych skutkuje serią nagłych zmian biochemicznych i metabolicznych. Brak tlenu zatrzymuje fosforylację oksydacyjną, prowadząc do zahamowania czynności skurczowej mięśnia sercowego<sup>34</sup>. Dochodzi także do rozkładu ATP, który jest niezbędny do utrzymania potencjału błony mitochondrialnej. Ze względu na spadek ATP, zależne od ATP pompy jonowe w błonie komórkowej nie mogą regularnie pracować, co powoduje nagromadzenie się wody, sodu i wapnia w komórce<sup>34</sup>. Podczas niedotlenienia metabolizm komórkowy przełącza się na glikolizę beztlenową, co powoduje gromadzenie się mleczanu i obniżenie wewnątrzkomórkowego pH (do  $\text{pH} < 7,0$ ). Obniżone pH uniemożliwia otwarcie megakanalu mitochondrialnego (ang. *mitochondrial permeability transition pore*, MPTP) i skurcz kardiomiocytów<sup>34</sup>. Wewnątrzkomórkowa akumulacja protonów aktywuje pompę jonową  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ , która wymienia protony z komórki w zamian za  $\text{Na}^+$ , prowadząc do nagromadzenia sodu w komórce. Brak ATP zatrzymuje działanie ATPazy  $3\text{Na}^+\text{-}2\text{K}^+$ , przyczyniając się do wewnątrzkomórkowego przeciążenia sodem. W odpowiedzi na przeciążenie sodem dochodzi do aktywacji pompy jonowej  $2\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ . Próba wymiany jonów  $\text{Na}^+$  prowadzi do wewnątrzkomórkowego przeciążenia wapniem<sup>35,36</sup>.

## **2.2. Uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne mięśnia sercowego**

Najczęściej stosowane strategie lecznicze w MI obejmują przywrócenie przepływu krwi w tkance objętej niedokrwieniem. Tromboliza, przezskórna interwencja wieńcowa (PCI) i pomostowanie aortalno-wieńcowe to najczęstsze metody leczenia ostrego MI<sup>37-39</sup>. Chociaż metody te przyczyniły się do zmniejszenia śmiertelności pacjentów z MI, możliwe jest pojawienie się komplikacji m.in. w postaci uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego (ang. *ischemia-reperfusion injury*, IRI) serca<sup>40</sup>. IRI definiuje się jako uszkodzenie tkanki serca, spowodowane niedokrwieniem, a następnie nagłym przywróceniem przepływu krwi w niedokrwionej i niedotlenionej tkance. W IRI zachodzi wiele procesów patofizjologicznych, w tym: akumulacja jonów, uszkodzenie błony

mitochondrialnej, powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), zaburzenia metabolizmu tlenku azotu (NO), dysfunkcja śródbłonna, agregacja płytek krwi, zapalenie, apoptoza i autofagia<sup>41</sup>. Szczególną rolę w apoptozie komórek w niedokrwieniu i reperfuzji (I/R) przypisuje się mitochondriom komórkowym. Śmierć komórek może być spowodowana kilkoma czynnikami: syntezą ROS, zmniejszoną zdolnością do syntezy ATP, wzrostem stężenia jonów wapnia w cytoplazmie i macierzy mitochondrialnej, zmianą objętości macierzy mitochondrialnej, otwarciem megakanąłu mitochondrialnego i inicjacją procesu apoptozy<sup>42</sup>.

### *Stres oksydacyjny*

Niski poziom utleniaczy warunkuje prawidłową mitozę komórkową, homeostazę i komunikację wewnątrzkomórkową, natomiast znacznie wzmożone powstawanie rodników może powodować uszkodzenie komórek<sup>43</sup>. Kardiomiocyty zawierają endogenne enzymy wychwytyjące wolne rodniki, takie jak dysmutaza nadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*, SOD), katalaza i peroksydaza glutationowa<sup>44</sup>. Przywrócenie dostaw tlenu podczas reperfuzji umożliwia reaktywację łańcucha transportu elektronów, generując ROS w ilościach przewyższających możliwości systemu antyoksydacyjnego. Inne źródła ROS w I/R obejmują oksydazę ksantynową – występującą w komórkach śródbłonna i oksydazę dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) – występującą w neutrofilach<sup>34,45</sup>. ROS pośredniczą w uszkodzeniu reperfuzyjnym mięśnia sercowego, indukując otwarcie MPTP, działając jako chemoatraktant dla neutrofilów i pośrednicząc w dysfunkcji retikulum sarkoplazmatycznego. Przyczyniają się także do wewnątrzkomórkowego przeciążenia  $Ca^{2+}$ , uszkodzania błony komórkowej poprzez peroksydację lipidów, indukcji denaturacji enzymów. Powodują również bezpośrednio uszkodzenie oksydacyjne łańcuchów DNA<sup>34</sup>. Wykazano, że egzogenne wolne rodniki hamują aktywność ATPazy sodowo-potasowej i ATPazy wapniowej retikulum sarkoplazmatycznego, prowadząc do wzrostu wapnia, oraz wpływają na integralność komórek<sup>46,47</sup>. Rodniki tlenowe powodują peroksydację lipidów, co może prowadzić do uszkodzenia błony komórkowej i w rezultacie spowodować obrzęk komórek (ang. *cell swelling*). Chemotaksja neutrofilów indukowana ROS może z kolei prowadzić do uszkodzenia naczyń włosowatych i dysfunkcji mikronaczyniowej. Ponadto krwinki białe, aktywowane w naczyniach włosowatych, są źródłem kolejnych rodników tlenowych<sup>48</sup>. Procesy oksydacyjne zachodzące podczas reperfuzji tkanki serca zapobiegają lub



ograniczają powstawanie NO, poprzez uszkodzenie wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, dlatego kardioprotekcyjne działanie NO jest zmniejszone. W rezultacie zwiększony stres oksydacyjny powoduje akumulację neutrofilów, powstawanie rodników ponadtlenkowych i zmniejszenie przepływu wieńcowego <sup>49</sup>.

#### *Udział wapnia w procesach reperfuzji*

Wewnątrzkomórkowe i mitochondrialne przeciążenie jonami wapnia rozpoczyna się podczas ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego i nasila się w czasie reperfuzji. Nagromadzenie  $Ca^{2+}$  w I/R wynika z uszkodzenia błony komórkowej, uszkodzenia retikulum sarkoplazmatycznego (pod wpływem stresu oksydacyjnego) i reaktywacji mitochondriów. Podczas reperfuzji dochodzi także do nagłego wzrostu wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  z powodu dysfunkcji retikulum sarkoplazmatycznego. W okresie reperfuzji, kiedy mitochondria podejmują regularną funkcję, zużywają energię na uwolnienie nadmiaru wapnia z cytozolu, co uniemożliwia oddychanie komórkowe i wytwarzanie energii. Przywrócenie potencjału błony mitochondrialnej wprowadza wapń do mitochondriów, a to może również indukować otwarcie MPTP <sup>34,45</sup>.

#### *Reperfuzja mięśnia sercowego a pH*

W AMI dochodzi do spadku  $pH < 7,0$ . Podczas reperfuzji, dzięki degradacji kwasu mlekowego i aktywacji wymiennika  $Na^+-H^+$  oraz symportera  $Na^+-HCO_3^-$ , dochodzi do przywrócenia fizjologicznego  $pH$ . Przywrócenie  $pH$  umożliwia otwarcie mitochondrialnych kanałów MPTP i skurcz kardiomiocytów <sup>45</sup>. Ta zmiana  $pH$  przyczynia się do śmierci kardiomiocytów w wyniku uszkodzenia reperfuzyjnego mięśnia sercowego <sup>50</sup>, umożliwiając otwarcie MPTP i powodując przykurcze kardiomiocytów w pierwszych kilku minutach reperfuzji. Badania eksperymentalne wykazały, że reperfuzja szczerzych miocytów za pomocą kwaśnego buforu wykazuje działanie kardioprotekcyjne <sup>51</sup>.

#### *Rola megakanalu mitochondrialnego MPTP w apoptozie komórek wywołanej IRI*

MPTP jest nieselektywnym kanałem wewnętrznej błony mitochondrialnej. Otwarcie kanału MPTP powoduje depolaryzację błony mitochondrialnej, prowadząc do wyczerpania ATP i śmierci komórki <sup>52</sup>. Wykazano, że w przypadku ostrego IRI mięśnia sercowego MPTP pozostaje zamknięty podczas niedokrwienia, a podczas reperfuzji

zostaje otwarty tylko przez kilka pierwszych minut, w odpowiedzi na akumulację mitochondrialnego  $\text{Ca}^{2+}$  i stres oksydacyjny<sup>53,54</sup>. Nadmierna akumulacja ROS i mitochondrialnego  $\text{Ca}^{2+}$  jest ważnym czynnikiem determinującym powstawanie MPTP. W wyniku otwarcia MPTP następuje uwolnienie cytochromu c, a następnie pęcznienie mitochondriów i upośledzenie depolaryzacji błon, zahamowanie produkcji ATP oraz aktywacja układu kaspazy i apoptozy komórek<sup>42,45</sup>. Hamowanie otwierania kanałów MPTP na początku reperfuzji, przez zastosowanie inhibitorów MPTP np. cyklosporyny A, wykazało efekt kardioprotekcyjny<sup>55</sup>.

Wykazano także zależny od stężenia wpływ NO na MPTP. Wysokie stężenie NO powoduje powstawanie MPTP, a NO w niskich stężeniach może hamować tworzenie MPTP<sup>56</sup>. Niskie stężenie NO chroni mitochondria przed czynnikami indukującymi apoptozę, takimi jak czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) i niedotlenienie<sup>57</sup>. NO aktywuje białko P53 i powoduje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, co również indukuje apoptozę<sup>58</sup>.

### *Zapalenie w IRI*

Nie jest jasne, czy odpowiedź zapalna towarzysząca AMI przyczynia się do patogenezy IRI mięśnia sercowego, czy też jest reakcją na ostre uszkodzenie mięśnia sercowego<sup>59</sup>. Aktywacja i uszkodzenie śródbłonka w wyniku IRI zwiększa przepuszczalność naczyń i rekrutację komórek zapalnych. Ekspresja cząsteczek adhezji komórkowej na uszkodzonym śródbłonku (np. cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ang. *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), cząsteczki adhezji komórkowej naczyń (ang. *vascular cellular adhesion molecule-1*, VCAM-1), selektyny E) sprzyja inwazji tkanek przez komórki zapalne, w tym neutrofile<sup>41</sup>. Badania wykazały, że hamowanie procesów zapalnych, m.in. przy użyciu przeciwciał przeciwko cząsteczkom adhezyjnym, w czasie reperfuzji, wykazuje efekt kardioprotekcyjny<sup>60</sup>. W ciągu sześciu godzin po rozpoczęciu reperfuzji mięśnia sercowego neutrofile gromadzą się w tkance mięśnia sercowego objętej zawałem w odpowiedzi na uwolnienie chemoatraktantów, ROS, cytokin i aktywowanego dopełniacza. Neutrofile w okolicy martwiczej uwalniają do środowiska enzymy proteolityczne, wytwarzają kolejne ROS i przyczyniają się do okluzji naczyń<sup>34,59</sup>. Oprócz komórek śródbłonka i neutrofilów, także płytki krwi są zaangażowane w procesy zapalne w IRI<sup>61-64</sup>. Udział płytek krwi w zapaleniu w IRI został szczegółowo opisany w rozdziale 3.

### 3. Znaczenie płytek krwi w MI i uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca

Pęknięcie niestabilnej blaszki miażdżycowej inicjuje aktywację płytek krwi i tworzenie zakrzepu, co prowadzi do zakrzepowej okluzji makroskopowych i mikroskopowych naczyń wieńcowych, skutkując niedokrwieniem i często AMI<sup>65,66</sup>.

Uszkodzenie śródbłonna naczyń w wyniku pęknięcia niestabilnej blaszki miażdżycowej prowadzi do ekspozycji białek podśródbłonkowych. Podśródbłonkowa macierz zewnątrzkomórkowa składa się głównie z włókien kolagenowych, proteoglikanów, GP i wody<sup>67</sup>. VWF, wydzielany z komórek śródbłonna, częściowo przylega do kolagenu macierzy podśródbłonkowej, w większości jednak uwalniany jest do światła naczynia<sup>68</sup>. Dzięki obecności kilku receptorów na powierzchni płytek możliwa jest adhezja płytek krwi do uszkodzonej ściany naczynia. Kompleks GPIb-IX-V i integryna  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 wiążą się do vWF związanego z kolagenem podśródbłonkowym. Natomiast GPVI i integryna  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (VLA-2, GPIa/IIa) wiążą się bezpośrednio z kolagenem podśródbłonkowym, stabilizując interakcję płytka krwi-ściana naczyń<sup>69-71</sup>. Adhezja płytek krwi do warstwy podśródbłonkowej wywołuje aktywację płytek, co skutkuje zmianami w morfologii i ekspresją receptorów, a to z kolei prowadzi do zmian w fenotypie płytek krwi<sup>72</sup>. Aktywowane płytki krwi uwalniają rozpuszczalne mediatory, takie jak tromboksan A2 (TXA2) i ADP, i wytwarzają trombinę<sup>73,74</sup>. W wyniku aktywacji płytek krwi aktywowana GP IIb-IIIa staje się zdolna do wiązania rozpuszczalnego fibrynogenu, umożliwiając w ten sposób agregację płytek krwi<sup>75</sup>. Uwolnieni w wyniku aktywacji agoniści: ADP, trombina, TXA2 przyczyniają się do tworzenia skrzepu, poprzez stymulację krążących płytek do aktywacji i agregacji w procesie zwanym rekrutacją płytek<sup>73,74</sup>. Niektóre mediatory uwalniane przez aktywowane płytki, takie jak prostaglandyna E2 (ang. *prostaglandin E2*, PGE2), nie wywołują agregacji, ale wzmacniają aktywację płytek indukowaną przez słabe bodźce i biorą udział w rekrutacji innych płytek do rosnącego czopu płytkowego<sup>76,77</sup>.

Udział płytek krwi w MI obejmuje wspomnianą niedrożność zakrzepową nasierdziowej tętnicy wieńcowej w miejscu erozji blaszki miażdżycowej, a także mikroembolizację zakrzepowych agregatów bogatych w płytki krwi, zwężenie naczyń zależne od płytek, nasilone wewnątrznacyniowe tworzenie skrzeplin w mikrokrążeniu i reakcje zapalne za pośrednictwem płytek krwi w niedokrwionym mięśniu sercowym<sup>78</sup>. Powyższe składowe determinują stopień niedokrwienia mięśnia sercowego i dysfunkcję

skurczową mięśnia sercowego, a tym samym obraz kliniczny choroby <sup>78</sup>. Mikroembolizacja prowadzi do zmniejszenia regionalnego przepływu wieńcowego, a następnie przemijającego niedokrwienia mięśnia sercowego <sup>78</sup>. Uwalnianie serotoniny, TXA2 i wolnych rodników przez płytki krwi w zatorowanych naczyniach prowadzi do skurczu naczyń <sup>78</sup>. Poza szkodliwą rolę płytek krwi w MI wykazano, że uwolnienie zawartości płytek krwi wpływa korzystnie na integralność śródbłonka naczyń wieńcowych <sup>79</sup>.

Standardowym sposobem leczenia niedokrwienia mięśnia sercowego jest rewaskularyzacja i przywrócenie przepływu krwi. Paradoksalnie przywrócenie przepływu krwi do wcześniej niedokrwionego mięśnia sercowego może spowodować dalsze uszkodzenie tkanek zwane IRI <sup>80</sup>. Strategie reperfuzji mają na celu rozpuszczenie czopu zakrzepowego wewnątrz nasierdziejowej tętnicy wieńcowej poprzez podanie środków fibrynolitycznych lub poprzez bezpośrednią PCI <sup>78</sup>. Początkowa faza reperfuzji charakteryzuje się brakiem równowagi jonowej i zaburzeniami w wymianie jonów  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , co przyczynia się do uszkodzenia mitochondriów i hiperskurczu mięśnia sercowego <sup>34</sup>. Następnie regeneracji mięśnia sercowego zagrażają mikroembolizacja, wytwarzanie ROS i niestabilność integralności ściany naczynia <sup>80</sup>. We wczesnych godzinach po reperfuzji dochodzi do nadmiernej rekrutacji leukocytów do zajętego mięśnia sercowego, co przyczynia się do IRI <sup>59</sup>.

Płytki krwi ulegają aktywacji na wczesnym etapie reperfuzji, po czym następuje akumulacja płytek w niedokrwionym mięśniu sercowym <sup>81</sup>. Ponieważ akumulacja neutrofilów podczas reperfuzji mięśnia sercowego zachodzi dużo później niż płytek krwi, płytki są jednymi z pierwszych komórek krwi, które podczas reperfuzji przylegają do układu naczyniowego, wcześniej niedokrwionego mięśnia sercowego <sup>82</sup>. Płytki krwi biorą udział w patofizjologii IRI poprzez kilka mechanizmów, takich jak: agregacja płytek i tworzenie mikrozakrzepów, tworzenie agregatów płytkowo-leukocytarnych, uwalnianie egzosomów i substancji o działaniu zwężającym naczynia krwionośne, powstawanie PMP i ciałek apoptotycznych <sup>83</sup>. Agregacja płytek krwi i powstawanie mikrozakrzepów w małych naczyniach sercowych i naczyniach włosowatych przyczynia się do uszkodzenia tkanki mięśnia sercowego <sup>83</sup>.

Efektem aktywacji płytek krwi jest uwolnienie zawartości ich ziarnistości <sup>84</sup>. Degranulacja może prowadzić do interakcji płytek z leukocytami oraz ze śródbłonkiem naczyniowym, skutkując rozwojem odpowiedzi zapalnej. Integryny  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  i  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  biorą udział w oddziaływaniu płytek krwi z macierzą wewnątrzkomórkową, śródbłonkiem

i leukocytami<sup>85</sup>. Selektyny i integryny, ekspresjonowane na błonie aktywowanych płytek, wiążąc się z receptorami błonowymi leukocytów, biorą udział w tworzeniu agregatów płytkowo-leukocytarnych<sup>63</sup>. Bezpośrednie wiązanie P-selektyny, ekspresjonowanej na powierzchni aktywowanych płytek krwi, z ligandem PSGL-1 (ang. *P-selectin glycoprotein ligand-1*, PSGL-1) neutrofilów inicjuje interakcję i formowanie agregatów płytkowo-neutrofilowych<sup>63,86</sup>. Aktywowana integryna neutrofilów  $\alpha$ M $\beta$ 2 (ang. *macrophage-1 antigen*, MAC-1) wiąże się z płytkami krwi w dwojaki sposób: bezpośrednio przez GPIIb $\alpha$  i pośrednio z udziałem fibrynogenu przez integrynę  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Wiązanie to zwiększa interakcję płytek krwi i neutrofilów oraz stabilizuje adhezję płytek krwi do neutrofilów<sup>87,88</sup>. Ostatnie badania pokazują, że w adhezji płytek krwi do neutrofilów bierze udział receptor powierzchniowy płytek CD147, który wiąże się z MAC-1 neutrofilów, jednak mechanizm tej interakcji nie jest znany<sup>64</sup>.

Agregaty płytkowo-leukocytarne sprzyjają dalszemu naciekaniu leukocytów do tkanki objętej MI i IRI<sup>83</sup>, natomiast zmniejszenie interakcji płytek krwi z neutrofilami redukuje IRI w tkance sercowej<sup>89</sup>. Wykazano związek między interakcjami płytek z neutrofilami a IRI, gdy w izolowanym modelu serca poddanego niedokrwieniu i reperfuzji, jednoczesna perfuzja buforem z płytkami krwi i neutrofilami nasiliła dysfunkcję skurczową serca<sup>90</sup>. Natomiast Seligman i in. wykazali, że płytki krwi i neutrofile podawane jednocześnie do serc świnek morskich narażonych na niedokrwienie o niskim przepływie nie wykazywały addytywnego działania kardiodepresyjnego<sup>91</sup>. Badania na zwierzętach wykazały pozytywny wpływ blokowania P-selektyny na rozwój sercowego IRI, objawiający się mniejszą infiltracją neutrofilów lub zmniejszoną adhezją płytek krwi do neutrofilów w obszarze zawału<sup>61,62</sup>. Dodatkowo wykazano, że serotonina uwalniana przez płytki krwi powodowała degranulację neutrofilów oraz zwiększała ekspresję cząsteczki adhezyjnej CD11b neutrofilów, prowadząc do nasilenia stanu zapalnego w obszarze zawału i zwiększenia IRI<sup>92</sup>.

Wykazano, że wzrost liczby krążących agregatów płytek krwi i monocytów może być niezależnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i naczyniowo-mózgowych, a występowanie ich w znacznej ilości może być wykorzystane jako czynnik predykcyjny u pacjentów po AMI<sup>93</sup>.

Rola płytek krwi w patogenezie IRI została również powiązana z wytwarzaniem ROS przez płytki krwi. W badaniach serc świnek morskich narażonych na I/R podanie aktywowanych płytek we wczesnej fazie reperfuzji prowadziło do jedynie częściowego przywrócenia pracy serca. W kardiodepresyjnym działaniu płytek krwi pośredniczyły

ROS<sup>94</sup>. Wykazano szkodliwy wpływ aktywowanych płytek na czynność lewej komory (ang. *left ventricle*, LV) serca po IRI<sup>95</sup>. Przeciwnie wyniki uzyskali Muessig i in. wykazując ochronne działanie osocza bogatopłytkowego (PRP) na regenerację i funkcję LV serca po IRI<sup>96</sup>. Ponadto uwolnione ze zaktywowanych płytek PMP, ciała apoptotyczne i egzozomy mogą potencjalnie nasilać stan zapalny w obrębie mięśnia sercowego w I/R<sup>83</sup>. Uwalnianie TXA2 dodatkowo prowadzi do dysfunkcji śródbłonka<sup>83</sup>. Mirabet i in. wykazali, że wpływ płytek krwi na mięsień sercowy poddany niedokrwieniu i reperfuzji zależy od obecności i stopnia aktywacji płytek. Zwiększona aktywacja płytek krwi skutkuje większą akumulacją płytek w mięśniu sercowym i dodatkowym uszkodzeniem mięśnia sercowego. Autorzy konkludują, że odmienne wyniki uzyskane przez badaczy mogą także wynikać z różnego stopnia aktywacji płytek krwi<sup>95</sup>.

### **3.1. Protekcyjna rola płytek krwi w MI**

Większość badań wskazuje na niekorzystny wpływ płytek krwi na niedokrwiony mięsień sercowy. Dodatkowo większość strategii terapeutycznych obejmuje zastosowanie terapii przeciwplatekowej, aby zapobiec dalszym zdarzeniom zakrzepowym i zahamować gromadzenie się płytek w mięśniu sercowym. Pierwsze doniesienia o pozytywnym wpływie trombocytów na mięsień sercowy w MI oraz IRI pojawiły się w latach 90 ubiegłego wieku. Prace opublikowane przez Yang i in. wykazały kardioprotekcyjne działanie płytek krwi na izolowane serca szczurze poddane I/R już przy perfuzji serca niską liczbą płytek<sup>97</sup>. Dodatkowo efekt kardioprotekcji został powiązany z uwalnianiem adenozyliny i TGF- $\beta$ 1<sup>98,99</sup>.

Jedną z cząsteczek, uwalnianych przez aktywowane płytki krwi, która wykazała właściwości kardioprotekcyjne, jest chemokina SDF-1 $\alpha$  (ang. *stromal cell-derived factor-1 alpha*). SDF-1 $\alpha$  uwalniana jest z ziarnistości  $\alpha$ , a receptor dla tej chemokiny (CXCR4) znajduje się na powierzchni kardiomiocytów<sup>100,101</sup>. Ochronny wpływ SDF-1 $\alpha$  na kardiomiocyty został powiązany z inicjalizacją sygnalizacji kinazy białkowej C (ang. *protein kinase C*, PKC)<sup>101</sup>. Interakcja pomiędzy SDF1- $\alpha$  a CXCR4 odgrywa również kluczową rolę w rekrutacji komórek progenitorowych do mięśnia sercowego objętego MI<sup>102</sup>. Wykazano, że SDF1- $\alpha$  powoduje opóźnienie śmierci kardiomiocytów narażonych na niedokrwienie i MI<sup>101</sup>. Dodatkowo zwiększona ekspresja SDF1- $\alpha$  na powierzchni płytek krwi u pacjentów z MI wiązała się z poprawą czynności serca i zmniejszeniem

rozmiaru zawału <sup>103</sup>, a najwyższą ekspresję SDF-1 $\alpha$  obserwowano w strefie objętej niedokrwieniem <sup>102</sup>.

Aktywacja płytek skutkuje uwolnieniem TGF- $\beta$ 1 z ziarnistości alfa. Podobnie jak w przypadku SDF-1 $\alpha$ , na powierzchni kardiomiocytów obecny jest receptor dla TGF- $\beta$ 1-TGF $\beta$ R1, a kardioprotekcyjne działanie TGF- $\beta$ 1 opiera się na mechanizmie sygnalizacji PKC <sup>101,104</sup>. Wykazano, że TGF- $\beta$ 1 działa ochronnie na mięsień sercowy szczura i zmniejsza apoptozę kardiomiocytów w wyniku niedotlenienia i reoksygenacji <sup>99,105</sup>. Inne badania wykazały wyższą ekspresję TGF- $\beta$ 1 na powierzchni płytek u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (ang. *acute coronary syndrome*, ACS) niż u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową. Ponadto niska ekspresja TGF- $\beta$ 1 płytek była związana ze zwiększoną śmiertelnością i częstością występowania MI z uniesieniem odcinka ST (STEMI) <sup>106</sup>.

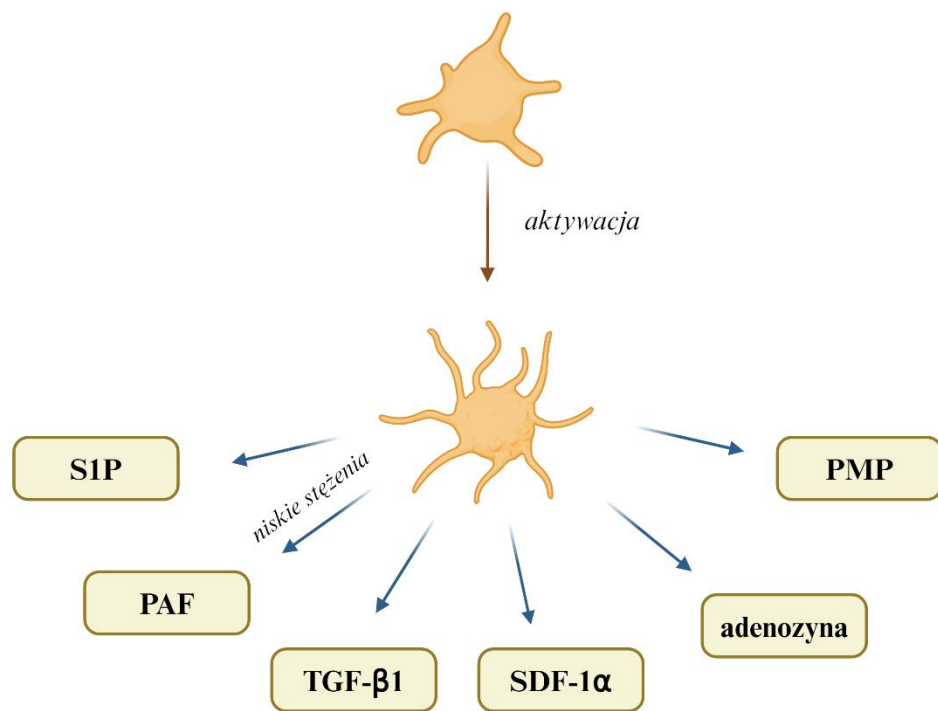
Sfingozyno-1-fosforan (ang. *sphingosine-1-phosphate*, S1P) jest uwalniany z aktywowanych płytek krwi podczas tworzenia skrzepu oraz w przebiegu procesów zapalnych, także w MI <sup>107</sup>. Płytki nie syntetyzują sfingozyny *de novo*, ale włączają sfingozynę pochodzenia zewnątrzkomórkowego. Następnie, dzięki kinazie sfingozyny, jest ona przekształcana w S1P i magazynowana w płytkach <sup>108</sup>. Badania wykazały, że S1P chroni perfundowane serca królików i myszy przed uszkodzeniem niedokrwinnym <sup>109,110</sup>. Badania *ex vivo* izolowanych kardiomiocytów i perfundowanych serc szczurów potwierdziły kardioprotekcyjne działanie S1P. Zaobserwowano wzrost żywotności kardiomiocytów w warunkach niedotlenienia oraz zmniejszenie wielkości MI po I/R <sup>111,112</sup>. S1P pośredniczył również w kardioprotekcji podczas prekondycjonowania niedokrwinnego (ang. *ischemic preconditioning*, IPC) i postkondycjonowania serc poddawanych I/R (ang. *ischemic postconditioning*, IPoC) <sup>113,114</sup>. Analogicznie do SDF-1 $\alpha$  i TGF- $\beta$ 1, na powierzchni kardiomiocytów obecne są także receptory dla S1P. Receptory S1P2 i S1P3 sprzężone z białkiem G są stymulowane podczas I/R i promują przeżycie kardiomiocytów <sup>115</sup>. Aktywacja receptorów S1P2 i S1P3 prowadzi do aktywacji szlaków sygnałowych RISK (ang. *reperfusion injury salvage kinases*) i SAFE (ang. *survivor activating factor enhancement*) <sup>113,115,116</sup>. Ponadto wykazano, że S1P wyzwała ochronę serca przez aktywację ścieżki sygnałowej kinazy 1 aktywowanej przez P21 (ang. *P21-activated kinase*, Pak1)/kinazy białkowej B (ang. *protein kinase B*, Akt)/śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (ang. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) <sup>117</sup>. Badania przeprowadzone przez Cohen i in. na sercach szczurzych wykazały, że kardioprotekcyjne działanie kangreloru, jednego z leków przeciwplatekcyjnych

i antagonistę płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub>, nie wynika jedynie z efektu antyagregacyjnego leku, ponieważ kangrelor nie zmniejszał rozmiaru zawału u szczurów z trombocytopenią, poddanych 30 minutowemu niedokrwieniu i następnie dwugodzinnej reperfuzji. Autorzy wykazali, że w mechanizmie ochronnym kangreloru konieczna jest interakcja leku z płytkami krwi i fosforylacja sfingozyny<sup>118</sup>. Penna i in. potwierdzili, że interakcja z płytkami jest konieczna dla ochrony tikagreloru, kolejnego antagonisty płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub>, w sercach szczurów. Ponadto tikagrelor może indukować uwalnianie S1P z płytek, co wyzwała efekt kardioproteincyny *in vivo*<sup>119</sup>.

Jak wspomniano wcześniej, aktywowane płytki krwi uwalniają adenozyne. Badania przeprowadzone na izolowanych sercach szczurzych narażonych na 40 minutowe niedokrwienie i 30 minutową reperfuzję wykazały, że uwalniana adenozyne pośredniczy w kardioprotekcji, chroniąc mięsień sercowy przed dysfunkcją i IRI<sup>98</sup>. Adenozyne wykazała także swoje właściwości kardioprotekcyjne u pacjentów z niewydolnością serca<sup>120</sup>. Mechanizm kardioprotekcyjny adenozyne opiera się na aktywacji szlaku RISK<sup>121</sup>. Badania wykazały, że tikagrelor zwiększa uwalnianie adenozyne z płytek krwi i analogicznie do S1P, także adenozyne jest zaangażowana w kardioprotekcyjny wpływ tikagreloru<sup>119</sup>.

Czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet activating factor*, PAF) jest fosfoglicerydem wytwarzanym przez płytki<sup>122</sup>. PAF działa na kardiomiocyty przez swoiste receptory (PAFRs) obecne na powierzchni komórek<sup>123</sup>. Jednak efekt działania PAF na mięsień sercowy poddany IRI jest zależny od stężenia PAF. Niskie stężenia PAF, w zakresie pmol/l, wywołują efekt kardioprotekcyjny w mechanizmie aktywacji kinaz sygnalizacyjnych RISK, w tym PKC, Akt i eNOS<sup>123,124</sup>. Natomiast wysokie stężenia PAF, w przedziale 1–10 nmol/l, wykazywały ujemne działanie inotropowe oraz silne działanie arytmogenne<sup>123</sup>. Czynniki pochodzenia płytkowego o potwierdzonym działaniu kardioprotekcyjnym przedstawiono na rycinie 2.





**Rycina 2. Czynniki pochodzenia płytkowego o działaniu kardioprotekcyjnym uwalniane w wyniku aktywacji płytek krwi.**

S1P – sfingozyno-1-fosforan, PAF – czynnik aktywujący płytki krwi, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu β1, SDF-1α – zrębowy czynnik 1 alfa, PMP – mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego. Obraz powstał przy użyciu BioRender.com.

Kolejnym czynnikiem wywołującym efekt kardioprotekcyjny, związanym z płytkami krwi jest zjawisko mitofagii. Mitofagia polega na degradacji uszkodzonych mitochondriów powstających m.in. w odpowiedzi na niedotlenienie<sup>125</sup>. Mitofagia płytek krwi ściśle łączy się z regulacją aktywacji płytek w warunkach MI i IRI<sup>126</sup>. Funkcjonalne mitochondria są niezbędne do ich prawidłowej aktywacji<sup>127</sup>. Dlatego dysfunkcyjne mitochondria płytek prowadzą do zmniejszonej produkcji ATP, upośledzonego buforowania wapnia i do wytwarzania ROS<sup>128</sup>. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że na wczesnych etapach niedokrwienia w wyniku mitofagii z płytek krwi usuwane są tylko uszkodzone mitochondria, co umożliwia aktywację płytek i ich udział w MI<sup>126,129</sup>. Ekspozycja płytek na dalsze niedotlenienie w I/R powoduje eliminację kolejnych mitochondriów i prawdopodobnie dochodzi także do mitofagii funkcjonalnych mitochondriów, co skutkuje zmniejszoną aktywacją płytek. Postuluje się, że mitofagia może stanowić mechanizm kardioprotekcji w I/R, gdyż chroni przed nadmierną aktywacją płytek i uszkodzeniem mięśnia sercowego poprzez negatywny mechanizm

samoregulacji <sup>126,129</sup>. W kardioprotekcyjne działanie mitofagii płytek zaangażowany jest receptor FUNDC-1, zlokalizowany na zewnętrznej błonie mitochondrialnej <sup>126</sup>. Wciąż poszukuje się nowych cząsteczek, które wpływając na poznane szlaki wewnątrzkomórkowe mogą prowadzić do kardioprotekcji wywołanej przez płytki krwi. Przykładem takiej cząsteczki jest melatonina, która reguluje zależną od FUNDC-1 mitofagię płytek, prowadząc do zmniejszenia aktywacji płytek i kardioprotekcji w IRI <sup>130</sup>.

#### 4. Mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) to struktury błoniaste, uwalniane z wielu komórek m.in. płytek krwi, komórek śródbłonna<sup>131</sup>, leukocytów<sup>132</sup>, erytrocytów<sup>133</sup>, w wyniku ich aktywacji lub apoptozy. Wśród EV wyróżniamy egzosomy, mikrocząsteczki (ang. *microparticles*, MP) i ciała apoptotyczne<sup>134</sup>. MP to fragmenty błon o średnicy od 0,1 do 1,0 µm, zawierające białka, informacyjny RNA (mRNA), mikroRNA (miRNA) i lipidy. MP mogą być uwalniane z komórek w wyniku różnych stanów patologicznych i mogą brać udział w patogenezie chorób, np. otyłości, cukrzycy, choroby nowotworowej<sup>135–138</sup>. MP zawierają fosfolipidy i fragmenty błon komórki, z której pochodzą, co umożliwia ich różnicowanie. W wyniku aktywacji płytki krwi uwalniają PMP. PMP prezentują białka powierzchniowe charakterystyczne dla płytek, takie jak: CD61, CD62P, CD63 i CD41. PMP wykazują właściwości prozakrzepowe, modulują interakcje międzykomórkowe i pośredniczą w procesach zapalnych<sup>139,140</sup>. W warunkach fizjologicznych PMP stanowią większość krążących MP. W ACS, w tym MI, stężenie PMP wzrasta, jednakże po ustabilizowaniu się choroby wraca do poziomu początkowego<sup>131</sup>. Wiele badań potwierdza, że PMP mogą służyć jako potencjalne markery MI i IRI w przyszłości. Liczba krążących PMP koreluje ze stopniem niedokrwienia i zakrzepicy u pacjentów z STEMI<sup>141</sup>. PMP posiadają wartość predykcyjną ryzyka wystąpienia AMI i wiążą się z rozległością uszkodzenia mięśnia sercowego w AMI<sup>142,143</sup>. Badania przeprowadzone na szczurach pokazały, że leki przeciwplatekcyjne mogą zmniejszać obszar zawału poprzez modyfikację PMP, a liczba PMP silnie koreluje z obszarem zawału. Stąd PMP można wykorzystać również do oceny wielkości zawału<sup>144</sup>. Dodatkowo PMP mogą stanowić biomarkery zwiększonego ryzyka nowych incydentów sercowo-naczyniowych u pacjentów po AMI<sup>145</sup>. Badania PMP u pacjentów z STEMI wykazały, że dzięki zawartym białkom PMP biorą udział w odpowiedzi zapalnej oraz nadmiernej agregacji płytek krwi odpowiedzialnej za zakrzepicę, mogą stanowić marker postępującej zakrzepicy u pacjentów ze STEMI<sup>146</sup> i mogą odgrywać rolę w patogenezie niedrożności naczyń mikrokrążenia<sup>147</sup>. Inne badania wykazały, że PMP mogą pełnić także funkcję antykoagulacyjną. PMP izolowane od szczurów poddanych prekondukcjonowaniu zwanym „hartowaniem na odległość” (ang. *remote ischemic pre-conditioning*, RIPC) zmniejszają obszar zawału i poprawiają czynność LV u szczurów poddanych IRI<sup>148</sup>. Ponadto PMP indukują angiogenezę i mogą przyczyniać się do rewaskularyzacji po przewlekłym niedokrwieniu, ponieważ wstrzyknięcie PMP do niedokrwionego mięśnia

sercowego wywołało zwiększenie liczby funkcjonujących naczyń krwionośnych poprzez aktywację szlaku RISK.<sup>149</sup> W swojej pracy Liu i in., poddając serca szczurze IPC, uzyskali krążące MP, które po izolacji i ultrawirowaniu podano dożylnie 5 minut przed reperfuzją szczurom narażonym na IRI. Wykazano ochronną rolę uzyskanych MP na serca szczurze narażone na IRI. MP wpływały na łagodzenie uszkodzenia mięśnia sercowego oraz przywrócenie czynności serca po IRI tj. zmniejszenie rozmiaru zawału, obniżenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej i liczby kardiomiocytów apoptotycznych, przyspieszenie akcji serca oraz zmniejszenie uniesienia odcinka ST<sup>150</sup>.

## 5. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP)

Aktywność enzymatyczna metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowych (MMP) po raz pierwszy została odkryta przez Grossa i in. jako aktywność kolagenolityczna w ogonie kijanek, podczas degradacji białek macierzy pozakomórkowej w procesie metamorfozy<sup>151</sup>. Ze względu na strukturę pierwszorzędową i specyficzność substratową, enzymy te podzielono na kilka grup. Podział metaloproteinaz na grupy przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1. Grupy metaloproteinaz**

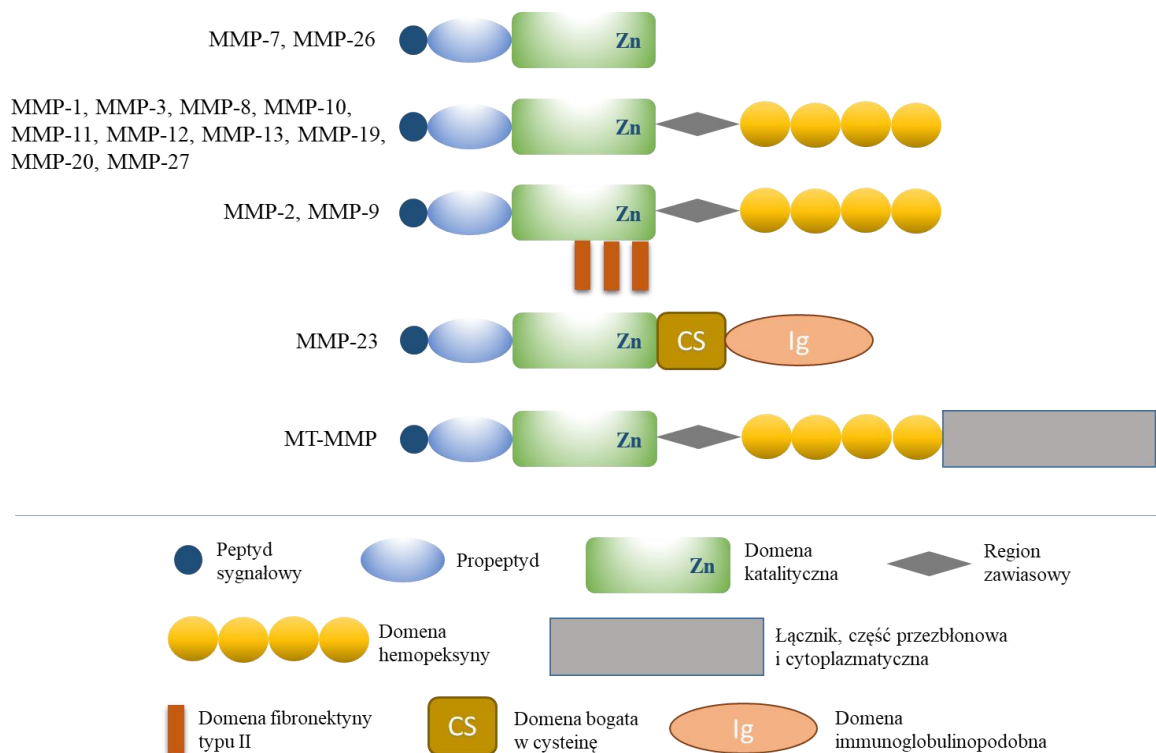
Grupa metaloproteinaz	MMP
kolagenazy	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18
żelatynazy	MMP-2, MMP-9
stromielizyny	MMP-3, MMP-10, MMP-11
matrylizyny	MMP-7, MMP-26
metaloproteinazy błonowe	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25
inne	MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28

[na podstawie ref. <sup>152,153</sup>].

### 5.1. Budowa MMP

MMP charakteryzuje budowa domenowa. W cząsteczkach wszystkich MMP można wyróżnić peptyd sygnałowy, prodomenę (propeptyd) z motywem cysteinowym oraz domenę katalityczną. Sekwencja sygnałowa enzymu znajduje się na końcu łańcucha z grupą aminową. Prodomena odpowiedzialna jest za utrzymanie enzymu w stanie nieaktywnym, dzięki znajdującej się wewnątrz tej sekwencji cysteinie, która oddziałuje z atomem cynku. W obrębie domeny katalitycznej znajduje się miejsce aktywne enzymu. Zawiera ono sekwencję aminokwasów z trzema cząsteczkami histydyny, które wiążą atom cynku, oraz resztą kwasu glutaminowego, która aktywuje cząsteczkę wody związaną z cynkiem. Oprócz katalitycznego jonu cynku w obrębie tej domeny znajduje się również dodatkowy jon cynku oraz od jednego do czterech jonów wapnia, odpowiadających za stabilizację struktury enzymu<sup>153,154</sup>. Najprostszą budową charakteryzują się MMP-7 oraz MMP-26. Pozostałe MMP za domeną katalityczną mają

usytuowany region zawiasowy i domenę hemopeksynową zakończoną grupą karboksylową. Region zawiasowy pełni funkcję łącznika i decyduje o specyficzności substratowej enzymów. Domena hemopeksynowa na końcu karboksylowym decyduje o wiązaniu enzymu do białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Związana jest także z procesem rozpoznawania substratów oraz wiązaniem inhibitorów. Taka budowa charakterystyczna jest dla MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-19, MMP-20 oraz MMP-27. W domenie katalitycznej żelatynaz (MMP-9 i MMP-2) obecna jest dodatkowa domena fibronektynopodobna, która odpowiada za przyłączanie enzymów do kolagenu i elastyny. W cząsteczkach MMP-11, MMP-21 oraz MMP-28 pomiędzy prodomeną a domeną katalityczną enzymu zawarta jest sekwencja rozpoznawana przez furynę. Dodatkowa sekwencja dla tych MMP związana jest z aktywacją enzymu w środowisku zewnątrzkomórkowym. Ta sekwencja obecna jest także w MMP błonowych (MT-MMP) tj. MMP-14, MMP-15, MMP-16 i MMP-24. Dodatkowo wymienione MMP błonowe charakteryzują się obecnością dwóch domen: transbłonowej i cytoplazmatycznej, które odpowiadają za zakotwiczenie enzymu w błonie komórkowej. MMP-17 i MMP-25 także należą do błonowych MMP, jednak zakotwiczone są poprzez domenę wiążącą glikozylofosfatydyloinozytol<sup>153,155</sup>. Schematyczną budowę domenową wybranych MMP przedstawiono na rycinie 3.



**Rycina 3. Schemat budowy domenowej wybranych MMP.**  
 Na podstawie ref. <sup>156,154</sup>.

## 5.2. Aktywacja MMP

Metaloproteiny są ściśle regulowane na poziomie aktywacji. Syntetyzowane jako pre-proenzymy są następnie wydzielane do macierzy zewnątrzkomórkowej w postaci nieaktywnego zymogenu, w którym cynk (w centrum aktywnym) jest zablokowany wiązaniem koordynacyjnym przez cysteinę N-końcowej części łańcucha białkowego. Nieaktywne zymogeny ulegają aktywacji przez tzw. przełącznik cysteinowy (ang. *cystein-switch*), który przerywa interakcję między cysteiną (w prodomenie) a jodem cynku (w centrum aktywnym). Dochodzi do zmian konformacyjnych cząsteczki MMP i zastąpienia grupy tiolowej cysteiny przez cząsteczkę wody. Następnie dochodzi do usunięcia propeptydu i odsłonięcia centrum aktywnego enzymu z jodem Zn<sup>152,155</sup>. Aktywacja zymogenu w macierzy zewnątrzkomórkowej może zachodzić na kilka sposobów: poprzez proteolizę wywołaną przez inne enzymy z rodziny MMP, przez działanie innych rodzajów enzymów np. proteazy serynowej, furyny, aktywatora plazminogenu i konwertazy, poprzez działanie ROS, a także poprzez allosteryczne zaburzenia zymogenu, które mogą prowadzić do nieodwracalnej aktywacji MMP na drodze autolizy<sup>152,153,155</sup>.

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) to cztery endogenne inhibitory MMP: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 oraz TIMP-4, które blokują aktywowane MMP poprzez wiązanie się do ich miejsc katalitycznych<sup>157</sup>. W budowie TIMPs wyróżnia się dwie domeny: domenę N-końcową, która wiążąc się z centrum aktywnym MMP zajmuje miejsce substratu i blokuje aktywność enzymu oraz domenę C-końcową, która wpływa na połączenie inhibitora z domeną hemopeksynową MMP<sup>154</sup>. TIMPs różnią się między sobą zdolnością do hamowania poszczególnych MMP. TIMP-1 wykazuje większe powinowactwo do MMP-9, natomiast TIMP-2 do MMP-2<sup>158</sup>. Hamowanie MMP przez TIMPs odbywa się w stosunku stechiometrycznym 1:1<sup>153</sup>. Dodatkowo TIMPs tworzą kompleksy z proMMP. Kompleksy TIMPs z pro-MMP są stabilizowane przez interakcje domen C-końcowych TIMPs z domenami hemopeksynowymi zymogenu. Interakcje TIMP z pro-MMP są stosunkowo specyficzne: TIMP-2, TIMP-3 lub TIMP-4 z pro-MMP-2 oraz TIMP-1 lub TIMP-3 z MMP-9. Ponieważ interakcje kompleksów TIMP z pro-MMP nie obejmują N-końcowej domeny TIMP, kompleksy są zdolne do interakcji z drugą cząsteczką MMP<sup>157</sup>. Kompleksy TIMPs z proMMP mogą brać udział w aktywacji proMMP, np. w aktywacji proMMP-2 biorą udział MMP-14 i TIMP-2. Domena katalityczna MMP-14 oddziałuje

z kompleksem pro-MMP-2-TIMP-2 poprzez domenę N-końcową TIMP-2 i tworzy trójskładnikowy kompleks związany z błoną komórkową. Aktywacja pro-MMP-2 jest wyzwalana przez rozszczepienie jego prodomeny przez drugą cząsteczkę MMP-14<sup>157</sup>. Aktywacja proMMP-2 przez TIMP-2 jest możliwa tylko przy stosunkowo niskim stężeniu TIMP-2<sup>153</sup>.

### 5.3. Funkcje MMP

MMP biorą udział w degradacji strukturalnych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen, laminina czy fibronektyna. Degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej ułatwia komórkom migrację<sup>159</sup>. Ponadto udział MMP w proteolizie macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzi do uwolnienia związanych cząsteczek sygnałowych, działających parakrynnie lub autokrynnie<sup>153</sup>. Kolejną rolę MMP jest pośredniczenie w interakcjach między komórkami oraz między komórkami a błoną podstawną, poprzez degradację połączeń między komórkami lub białek budujących błonę podstawną<sup>153</sup>. Dodatkowo MMP bezpośrednio aktywują cytokiny, chemokiny, receptory powierzchniowe komórek, czynniki wzrostu i inne proteazy<sup>152</sup>. Dzięki swojemu działaniu MMP przyczyniają się do podstawowych procesów, takich jak: proliferacja, różnicowanie, adhezja, migracja i apoptoza komórek<sup>152</sup>. Działanie MMP na składniki macierzy zewnątrzkomórkowej powoduje, że określone MMP wpływają na szereg procesów fizjologicznych i patofizjologicznych, włączając: kontrolę biologii komórek macierzystych<sup>160,161</sup>, angiogenezę<sup>162</sup>, reprodukcję<sup>163</sup>, embriogenezę, przebudowę i naprawę tkanek<sup>164</sup>, choroby ośrodkowego układu nerwowego<sup>165</sup>, choroby naczyniowe, choroby płuc<sup>166</sup>, zapalenie<sup>167</sup> i nowotwory<sup>161</sup>. Ze względu na zakres niniejszej pracy rola wybranych MMP w MI i IRI została szczegółowo opisana w kolejnych podrozdziałach.

### 5.4. Metaloproteinazy płytek krwi

W płytkach krwi zidentyfikowano: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-4 oraz TIMP-1, TIMP-2 oraz TIMP-4.<sup>12</sup> Na potrzeby niniejszej pracy dokładniej, w kontekście płytek krwi, zostaną opisane dwie MMP: MMP-2 oraz MMP-9.

Płytki krwi zawierają i podczas aktywacji uwalniają MMP-2 (żelatynazę A). W stanie spoczynku płytki krwi zawierają niewielką ilość MMP-2 ( $0,3 \pm 0,1$  ng/ $10^8$  płytek). Aktywacja i agregacja płytek krwi, np. przy udziale trombiny lub kolagenu, skutkuje



przemieszczeniem pro-MMP-2 z cytozolu na powierzchnię płytki, gdzie ulega ona aktywacji do MMP-2. Następnie aktywna forma MMP-2 zostaje uwolniona w znacznej ilości ( $17,3 \pm 3,7$  ng/ $10^8$  płytek) do przestrzeni pozakomórkowej<sup>168,169</sup>. Chociaż MMP-2 nie jest w stanie doprowadzić do agregacji płytek spoczynkowych dowiedziono, że MMP-2 w niskich stężeniach wzmaga odpowiedź płytek na niskie stężenia agonistów, np. kolagenu, AA, trombiny i ADP<sup>170-172</sup>. Dodatkowo wykazano, że wysokie stężenie MMP-2 powodowało zahamowanie indukowanej kolagenem agregacji płytek krwi<sup>172</sup>. Wykazano także, że aktywność MMP-2 w płytkach jest proporcjonalna do ich wielkości, a w małych płytkach może być trudna do wykrycia<sup>173</sup>.

Do receptorów powierzchniowych płytek krwi wiążących MMP-2 należą: integryna  $\alpha_v\beta_3$ , GP IIb-IIIa oraz receptor aktywowany przez proteazy 1 (PAR1)<sup>169</sup>. Wiązanie receptora GP IIb-IIIa z wewnątrzkomórkową MMP-2 prowadzi do regulacji aktywacji i agregacji płytek krwi indukowanej agonistą<sup>174</sup>. PAR1, główny receptor trombiny na ludzkich płytkach, może być aktywowany przez MMP, w tym także MMP-2<sup>175</sup>. Ponadto enzymatyczne rozszczepienie PAR-1 przez MMP-2 poprzedza wiązanie MMP-2 z receptorem dla GP IIb-IIIa, co w efekcie prowadzi do aktywacji płytek krwi<sup>176</sup>. Wykazano, że wewnątrzkomórkowa aktywna forma MMP-2 wpływa na aktywację i agregację płytek poprzez hydrolityczną aktywację taliny, która jest związana z aktywacją GP IIb-IIIa<sup>174</sup>.

Płytki krwi uwalniają pro-MMP-2 i aktywną postać MMP-2 w miejscu uszkodzenia naczyń *in vivo*. Ilość uwalnianej lokalnie MMP-2 jest zdolna do wzmocnienia odpowiedzi płytek na bodziec<sup>177</sup>. Badania przeprowadzone u pacjentów z ACS wykazały, że MMP-2 jest uwalniana do krążenia wieńcowego i pochodzi w większości z płytek krwi. Uwalniane MMP-2 przez płytki aktywowane w miejscu pęknięcia blaszki miażdżycowej może silnie przyczyniać się do przedłużonej wewnątrzwieńcowej aktywacji płytek. MMP-2 może zatem odgrywać rolę w tworzeniu skrzepliny *in vivo*<sup>178</sup>. Inne badania wykazały, że aktywna forma MMP-2, dodawana egzogennie lub uwalniana przez aktywowane płytki krwi zwiększa ich aktywację wywołaną naprężeniem ścinającym i nasila odkładanie się płytek na kolagenie, promując rekrutację płytek do rosnącego zakrzepu<sup>179</sup>. MMP-2 może zatem odgrywać istotną rolę w tworzeniu skrzepliny w miejscach zwiększonego naprężenia ścinającego *in vivo*, jak w zwężonych miażdżycowych tętnicach wieńcowych lub w stanach wzmożonego uwalniania MMP-2 przez płytki krwi lub ścianę naczynia<sup>169,179</sup>.

Obecność MMP-9 (żelatynazy B) w płytkach krwi pozostaje kwestią dyskusyjną. Część badaczy potwierdziło obecność MMP-9 w płytkach <sup>180</sup>, inni temu zaprzeczają <sup>173,181</sup>. Przyczyną niewykrycia MMP-9 w płytkach może być zastosowanie metod o niskiej czułości diagnostycznej. Inni uważają, że MMP-9 jest uwalniana podczas tworzenia propłytek z megakariocytów, natomiast nie jest obecna w dojrzałych płytkach krwi <sup>182</sup>. Wykrycie MMP-9 w płytkach może być również związane z zanieczyszczeniem badanych płytek leukocytami, dlatego niezmiernie ważny jest właściwy sposób izolacji płytek <sup>173</sup>. Dodatkowo wykazano, że aktywowane płytki są zdolne do wiązania MMP-9 ze środowiska, stąd wykrywana MMP-9 w płytkach może pochodzić z osocza <sup>183</sup>.

Udowodniono, że w przeciwieństwie do MMP-2, MMP-9 hamuje agregację płytek indukowaną przez agonistów <sup>184</sup>. Aktywna MMP-9 może powodować zmiany konformacyjne błon płytek krwi oraz tworzenie rodników hydroksylowych, co prowadzi do zahamowania agregacji. Kolejnym prawdopodobnym mechanizmem hamującego działania MMP-9 jest blokowanie antyportera  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , co prowadzi do zmniejszonej mobilizacji  $\text{Ca}^{2+}$  wewnątrzkomórkowego i zahamowania agregacji <sup>184</sup>. Aktywowana MMP-9 zwiększa również wytwarzanie tlenku azotu oraz cyklicznego GMP, powodując hamowanie agregacji płytek. Dodatkowo aktywowana MMP-9 hamuje rozpad fosfatydyloinozytolu, mobilizację wewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$  i tworzenie tromboksanu A<sub>2</sub>, co prowadzi do zahamowania agregacji płytek krwi <sup>180</sup>.

### **5.5. Rola metaloproteinaz w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca**

W kardiomiocytach wykryto mRNA dla MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 i MMP-14, natomiast synteza białek ogranicza się do trzech MMP: MMP-2, MMP-9 i MMP-14 <sup>185</sup>. Na potrzeby niniejszej pracy poniżej szczegółowo omówiono znaczenie dwóch MMP: MMP-2 i MMP-9 w uszkodzeniu serca wywołanym I/R.

MMP-2 jest syntetyzowana jako zymogen przez różne komórki, w tym miocyty serca, i jest aktywowana przez proteazy <sup>186</sup> lub na drodze post-translacyjnych modyfikacji enzymu w wyniku zwiększonego stresu oksydacyjnego. Nadtlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) generowany na etapie wczesnej reperfuzji po niedokrwieniu <sup>187</sup>, bezpośrednio aktywuje kilka MMP <sup>188</sup>.  $\text{ONOO}^-$  w obecności glutationu aktywuje MMP-2 poprzez mechanizm nieproteolityczny, obejmujący S-glutationylację reszty cysteiny w domenie autohamującej propeptydu <sup>189</sup>.

W miocytach serca MMP-2 lokalizuje się w cienkich i grubych miofilamentach sarkomeru<sup>190,191</sup>, w cytoszkielecie<sup>192</sup>, jądrze<sup>193</sup>, mitochondriach<sup>190</sup> i kaweolach<sup>194,195</sup>. Badania przeprowadzone na perfundowanych sercach szczurzych narażonych na I/R wykazały, że MMP-2 ulega aktywacji w wyniku stresu oksydacyjnego i jest głównym mediatorem ostrej mechanicznej dysfunkcji serca po I/R<sup>196,197</sup>. Aktywacja MMP-2 zachodzi zarówno na wczesnym etapie niedokrwienia, jak i w wyniku następowej reperfuzji<sup>197,198</sup>. Aktywna postać MMP-2 w IRI jest odpowiedzialna za degradację troponiny I<sup>190,199</sup>, łańcuchów lekkich miozyny-1 (ang. *myosin light chain 1*, MLC1)<sup>191</sup>,  $\alpha$ -aktyny<sup>192</sup> i tytyny<sup>200</sup>. Reperfuzja serc szczurzych poddanych I/R skutkuje uwolnieniem z serca dużych ilości MMP-2 do krążenia, a wyrzut MMP-2 koreluje z dysfunkcją serca po reperfuzji<sup>196,201</sup>. Wykazano, że degradacja MLC1 pod wpływem MMP-2 w odpowiedzi na I/R zachodzi ściśle w fazie reperfuzji, natomiast w fazie niedokrwienia dochodzi do hamowania degradacji MLC1 przez TIMP-4<sup>198</sup>. Spośród wszystkich TIMPs, TIMP-4 ulega najwyższej ekspresji w sercu i jest uwalniany z kardiomiocytów w warunkach I/R<sup>202</sup>. Wykazano, że TIMP-4 jest niezbędny do regeneracji mięśnia sercowego *in vivo*<sup>203</sup>, a uwalniany z kardiomiocytów w wyniku I/R prowadzi do zwiększonej aktywności MMP i w konsekwencji przyczynia się do sercowego IRI<sup>202</sup>. Badania przeprowadzone z udziałem myszy transgenicznych, ze specyficzną dla mięśnia sercowego ekspresją zmutowanej, konstytutywnie aktywnej MMP-2, wykazały, że aktywna MMP-2 jest wystraczającym czynnikiem do wywołania poważnej przebudowy komórek i dysfunkcji skurczowej. Myszy transgeniczne nienarażone na dodatkowe uszkodzenia np. I/R wykazywały znacznie upośledzoną funkcję skurczową serca, zaburzenia w budowie sarkomerów i mitochondriów, głęboką lizę miofilamentu, rozpad rejestracji pasma Z i obniżony poziom troponiny I, a także deorganizację miocytów z obecnością włóknienia<sup>199</sup>. Badania wykazały również kardioprotekcyjne działanie inhibitorów MMP. Zahamowanie aktywności MMP-2 doprowadziło do poprawy funkcji skurczowej serca oraz zmniejszonej degradacji białek kurczliwych<sup>190-192,199,200</sup>. Pomimo że w badaniach na zwierzętach uzyskano efekt kardioprotekcyjny w IRI dzięki zastosowaniu inhibitorów MMP, w randomizowanych badaniach klinicznych zastosowanie nieselektywnego inhibitora MMP nie zmniejszyło przebudowy LV ani nie poprawiło wyników klinicznych u pacjentów z AMI<sup>204</sup>. W związku z powyższym większość badań w tym zakresie obejmuje zastosowanie selektywnych inhibitorów MMP-2<sup>205</sup>. Karwedilol,  $\beta$ -bloker trzeciej generacji, także wykazał efekt kardioprotekcyjny przez zmniejszenie aktywacji MMP-2 i obniżenie

degradacji troponiny I, co w konsekwencji może prowadzić do ochrony przed dysfunkcjami skurczowymi mięśnia sercowego poddanego I/R <sup>206</sup>. Dodatkowo perfundowanie serc szczurzych mieszaniną leków: doksycyliny (inhibitora MMP-2), ML-7 (inhibitora kinazy lekkich łańcuchów miozyny) oraz 1400W (selektywnego inhibitora indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS)) w dawkach subterapeutycznych wykazało pozytywne skutki zarówno w prewencji, jak i leczeniu uszkodzenia wywołanego I/R <sup>207</sup>.

W badaniach przeprowadzonych na izolowanych sercach szczurzych poddanych prekondycjonowaniu niedokrwiennemu, z trzema pięciominutowymi okresami globalnego niedokrwienia i następującą pięciominutową reperfuzją tlenową, przed I/R, wykazano zmniejszoną aktywację i uwalnianie MMP-2 <sup>201</sup>. Inne badania prekondycjonowania niedokrwiennego wykazały obniżone stężenie sercowego nadtlenoazotynu, który wiązał się ze zmniejszoną aktywacją MMP-2, co doprowadziło do kardioprotekcji <sup>208</sup>. Dodatkowo rola MMP-2 została zauważona w IPoC. Autorzy stwierdzili, że kardioprotekcyjne działanie IPoC może częściowo wynikać z hamowania aktywności MMP-2 <sup>209</sup>.

W IRI serca dochodzi do uszkodzenia siateczki sarkoplazmatycznej (ang. *sarcoplasmic reticulum*, SR), która jest głównym wewnątrzkomórkowym organellum magazynującym wapń w kardiomiocytach, krytycznym dla skoordynowanych skurczów i relaksacji. Pompa wapniowa SR SERCA2a (ang. *sarco/endoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase 2a*) podczas rozkurczu przemieszcza wapń do SR. Przemieszczenie wapnia ułatwia relaksację mięśnia sercowego, decydując nie tylko o szybkości relaksacji, ale także o pojemności wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia, co ostatecznie decyduje o sile skurczu przy kolejnych uderzeniach serca <sup>210</sup>. W badaniach wykazano większy obszar zawału i pogorszenie funkcji mięśnia sercowego po reperfuzji u heterozygotycznych myszy z knock-out SERCA2a <sup>211</sup>. Badania przeprowadzone na izolowanych perfundowanych sercach szczurzych poddanych I/R wykazały, że selektywna inhibicja MMP-2 skutkowałą poprawą kurczliwości serca po I/R oraz zmniejszonym wytwarzaniem fragmentu degradacji SERCA2a o masie 70 kDa <sup>212</sup>. Dalsze eksperymenty *in vitro*, polegające na inkubacji mikrosomów sercowych wzbogaconych w SR z egzogenną MMP-2, również doprowadziły do proteolizy SERCA2a. Dane te stanowią mocny dowód na to, że MMP-2 jest inaktywatorem SERCA2a, co przyczynia się do wczesnej dysfunkcji skurczowej po reperfuzji <sup>205,212</sup>.

Junktofilina-2 (JPH-2) jest strukturalnym białkiem błonowym, które wiąże kanałiki T z SR, umożliwiając skoordynowane uwalnianie wapnia. Ostatnie badania wykazały, że degradacja JPH-2 przez MMP-2 jest wczesną konsekwencją IRI w mięśniu sercowym i może prowadzić do upośledzenia funkcji skurczowej mięśnia sercowego <sup>213</sup>.

Kolejną MMP, której stężenie ulega podwyższeniu w wyniku MI jest MMP-9 <sup>214</sup>. Sercowa MMP-9 znajduje się w miocytach, fibroblastach i komórkach wsierdzia <sup>215</sup>. MMP-9 działa proteolitycznie na białka macierzy zewnątrzkomórkowej i bierze udział w długotrwałych procesach przebudowy w przebiegu miażdżycy tętnic i niewydolności serca <sup>215</sup>. Aktywacja MMP-9 w wyniku niedokrwienia i stanu zapalnego zachodzi pod wpływem NO i ROS w mechanizmie S-nitrozylacji (transfer tlenu azotu do kluczowej grupy tiolowej cysteiny) i późniejszego utleniania <sup>152,188</sup>. Neutrofile są wczesnym źródłem MMP-9 w chorobie niedokrwiennej serca. Podczas pierwszych godzin reperfuzji po MI naciekające neutrofile uwalniają aktywną MMP-9 <sup>216</sup>. W badaniach przeprowadzonych na heterozygotycznych i homozygotycznych myszach transgenicznym z wyciszonym genem dla MMP-9, poddanych I/R, wykazano zmniejszenie obszaru zawału oraz mniejszą infiltrację neutrofilów do niedokrwionego mięśnia sercowego w porównaniu do myszy bez wyciszonego genu dla MMP-9 <sup>217</sup>. Inne badania na myszach z delecją MMP-9 wykazały osłabioną przebudowę LV po MI oraz zwiększoną neowaskularyzację w przebudowie mięśnia sercowego <sup>218,219</sup>. Zastosowanie inhibitorów MMP u myszy narażonych na MI wykazało osłabienie przebudowy LV <sup>216</sup>. Lan i in. w badaniu na zwierzętach wykazali, że leczenie melatoniną chroniło serce przed IRI, poprzez zmniejszenie ekspresji MMP-9 <sup>220</sup>. Ostatnie badanie wykazało, że podawanie melatoniny u pacjentów z AMI poddawanych pierwotnej przezskórnej interwencji wieńcowej w porównaniu do pacjentów, którym podano placebo, wiązało się z lepszymi wynikami średniego czasu przeżycia podczas dwuletniej obserwacji oraz zmniejszonym stężeniem MMP-9 w surowicy u tych pacjentów <sup>221</sup>.

## 6. CEL PRACY

Zawał mięśnia sercowego wciąż pozostaje główną przyczyną zachorowalności i śmiertelności na całym świecie, stanowiąc 46% wszystkich zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych u mężczyzn i 38% u kobiet. Głównym wyzwaniem po niedokrwieniu zawałowym jest ograniczenie IRI. Płytki krwi odgrywają główną rolę w patogenezie MI i IRI, ponieważ przyczyniają się do tworzenia zakrzepów i mikrozakrzepów, biorą udział w procesach zapalnych, uwalniają szereg mediatorów immunomodulacyjnych i cząsteczek zwężających naczynia. Powszechnie stosowane terapie przeciwplatekcyjne okazały się skuteczne w zapobieganiu zakrzepicy i odgrywają ochronną rolę w IRI serca. Jednakże rola płytek krwi w zawałach mięśnia sercowego i IRI nadal pozostaje niejasna. W latach 90. pojawiły się pierwsze doniesienia o ochronnym działaniu cząsteczek uwalnianych z płytek krwi podczas zawału serca. Badania wskazują, że uwalniane z płytek krwi: chemokina SDF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, S1P oraz PAF mogą wywoływać efekt kardioprotekcyjny, jednakże mechanizmy tego działania nadal wymagają wyjaśnienia. Upatruje się także roli mitofagii jako jednego z możliwych mechanizmów kardioprotekcji oraz roli PMP w indukcji angiogenezy i rewaskularyzacji po przewlekłym niedokrwieniu, jednak zagadnienia te nadal nie są w pełni poznane.

Kluczowe zatem wydaje się ustalenie funkcji płytek krwi w MI i IRI oraz poznanie mechanizmów wzajemnego oddziaływania płytek krwi i kardiomiocytów. Obecnie stosowana farmakoterapia w MI i IRI skupia się m.in. na hamowaniu aktywacji i agregacji płytek krwi. Wykazanie efektu kardioprotekcyjnego płytek krwi i poznanie mechanizmu tego zjawiska może przyczynić się do zmiany w stosowanym leczeniu.

Biorąc pod uwagę powyższe, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było sprawdzenie:

- a. Czy w warunkach I/R płytki krwi ulegają aktywacji, w wyniku której uwalniają PMP?
- b. Czy płytki krwi wpływają na zmianę ekspresji i aktywności MMP-2 oraz MMP-9 w kardiomiocytach?
- c. Czy płytki krwi wywierają efekt ochronny na kardiomiocyty poddane I/R?

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Analizę markerów aktywacji płytek krwi oraz ekspresji markerów aktywacji płytek krwi na powierzchni PMP.

2. Analizę zmiany aktywności MMP-2 i MMP-9 w kardiomiocytach i płytkach krwi po I/R oraz w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia i po etapie reperfuzji, wraz z oceną ekspresji genów MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi i kardiomiocytach po I/R.
3. Sprawdzenie, jak obecność płytek krwi podczas I/R wpływała na uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH), aktywność metaboliczną kardiomiocytów oraz ekspresję iNOS w komórkach serca.

Wyniki badań mogą udzielić informacji na temat wpływu płytek krwi na kardiomiocyty poddane I/R.

## II. MATERIAŁ I METODY

### 1. Materiał

Materiał do badań stanowiły hodowlane ludzkie miocyty serca (nr kat. #6200, HCM, PromoCell, Heidelberg, Niemcy) oraz płytki krwi wyizolowane bezpośrednio po pobraniu krwi pełnej od zdrowego ochotnika. Materiał pobrano od 20 zdrowych ochotników, którzy nie przyjmowali żadnych leków w ciągu 14 dni przed pobraniem. Krew pobrano z żyły łokciowej przy użyciu systemu zamkniętego (S-Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy), igłą 20 G o średnicy zewnętrznej 0,9 mm do polipropylenowych probówek zawierających 106 mM cytrynianu sodu w proporcji: 9 części krwi do 1 części cytrynianu (v/v). Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu numer KB-421/2021.

### 2. Metody

#### 2.1. Izolacja płytek krwi

*Aparatura i wyposażenie:*

- Próbkowko-strzykawka z cytrynianem sodu (106 mM) na 10 ml krwi (nr kat. 02.1067.001, Sarstedt) i igła 20 G x 3/4 TW 0,9 x 19 mm Safety- Multifly®-Needle (nr kat. 85.1160, Sarstedt)
- Próbkowki polipropylenowe, okrągłodenne, średnica 16 mm, długość 100 mm, pojemność 11 ml, z dopasowanym korkiem (nr kat. 20.1611.0, Medlab, Raszyn, Polska)
- Automatyczne pipety miarowe
- Wirówka laboratoryjna 3K 15 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy)
- Analizator hematologiczny KX-21N (Sysmex, Hyogo, Japonia)

*Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **1 M TRIS/HCl, pH 9,5:**  
1,2 g Trizma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 10 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 9,5 roztworem HCl o stężeniu 35%.



- **Roztwór prostacykliny PGI<sub>2</sub>:**  
1 mg PGI<sub>2</sub> (nr kat. P-6188, Sigma-Aldrich) rekonsytuowano w 1 ml zimnego buforu 1 M TRIS/HCl, pH 9,5, procedurę przeprowadzono na lodzie. Przygotowany roztwór przechowywano w małych porcjach, w temperaturze – 80°C i rozmrażano bezpośrednio przed użyciem.
- **Bufor HEPES-NaCl (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4):**  
4,1 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH, Gliwice, Polska) i 2,6 g HEPES (nr kat. H7006, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.
- **Roztwór gradientu o gęstości 1,063 g/ml (OptiPrep, nr kat. D1556, Sigma-Aldrich):**  
10 ml gradientu OptiPrep rozcieńczono 44,3 ml buforu HEPES-NaCl.
- **Bufor HEPES (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glukoza, 10 mM tauryna, 5 mM HEPES, pH 7,4):**  
0,3535 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,0187 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR, Piekary Śląskie, Polska), 0,0102 g MgCl<sub>2</sub> (nr kat. 363-116120500, CHEMPUR), 0,05 g glukozy (nr kat. 114595600, CHEMPUR), 0,0625 g tauryny (nr kat. T0625, Sigma-Aldrich) i 0,0655 g HEPES (nr kat. H7006, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.
- **1 M CaCl<sub>2</sub>**  
1,47 g CaCl<sub>2</sub> (nr kat. 118748706, CHEMPUR) rozpuszczono w 10 ml H<sub>2</sub>O.
- **Bufor F (14,8 mM BSA)**  
150 mg BSA (nr kat. A3294, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 50 ml buforu HEPES z dodatkiem 5 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>.

**Izolację płytek krwi z krwi cytrynianowej, wolnych od zanieczyszczeń komórkowych, przeprowadzono zgodnie z procedurą:**

1. Do próbek z krwią pełną dodano 20 µl roztworu PGI<sub>2</sub> uzyskując końcowe stężenie w próbkach 2 µg/ml.
2. Krew odwirowano przez 20 minut z siłą 200 × g.

3. Z odwirowanych probówek zebrano PRP do polipropylenowych probówek. PRP rozcieńczono dwukrotnie buforem HEPES-NaCl i dodano prostacyklinę, uzyskując stężenie końcowe 0,3 µg/ml.
4. Do polipropylenowych probówek odpipetowano po 5 ml gradientu i nawarstwiono po 3 ml rozcieńzonego PRP.
5. Probówki wirowano przez 20 minut z siłą  $300 \times g$ .
6. Do polipropylenowych probówek zebrano płytki krwi z powstałej interfazy ( $2 \times 3,7$  ml), a następnie do płytek krwi dodano prostacyklinę, uzyskując stężenie końcowe 0,3 µg/ml.
7. Probówki wirowano przez 10 minut z siłą  $900 \times g$ .
8. Usunięto nadsącz, do probówek dodano po 1 ml buforu HEPES-NaCl i prostacyklinę, uzyskując stężenie końcowe 0,3 µg/ml, wymieszano delikatnie przez aspirację.
9. Probówki wirowano przez 10 minut z siłą  $800 \times g$ .
10. Usunięto nadsącz, do probówek dodano po 1 ml buforu F i prostacyklinę, uzyskując stężenie końcowe 0,3 µg/ml, wymieszano delikatnie przez aspirację.
11. Liczba płytek krwi została zmierzona na analizatorze hematologicznym Sysmex KX-21N.

## 2.2. Hodowla komórkowa

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Komora laminarna (Mars Safety Classe 2, SCANLAF, Lillerød, Dania)
- Ciepłarka z dozowaniem CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (MCO-18AC, SANYO, Osaka, Japonia)
- Karbogen
- Mikroskop odwrócony (MW-100, OPTA-TECH, Warszawa, Polska)
- EVE Automatic Cell Counter (NanoEntek, Seul, Korea)
- Wirówka (MPW-223e, MPW, Warszawa, Polska)
- Ciekły azot

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- Ludzkie miocyty serca (Human Cardiac Miocytes (HCM), nr kat. #6200, PromoCell,)
- Poly-L-lizyna (nr kat. P4707, Sigma-Aldrich)

- Penicylina/Streptomycyna (nr kat. P0781, Sigma-Aldrich) o stężeniu 10000 U penicyliny i 10 mg streptomycyny/ml w 0,9% NaCl
- Filtry strzykawkowe z membraną o średnicy porów 0,22  $\mu\text{m}$  (nr kat. 6-0047, Bionovo, Emeryville, USA)
- Medium hodowlane (Myocyte Growth Medium (Ready-to-use) wraz z Supplement Mix, nr kat. C-22070, PromoCell)

500 ml medium hodowlanego (Myocyte Growth Medium) zmieszano z 25,4 ml suplementu (Myocyte Growth Medium Supplement Mix) i dodano 5 ml Penicyliny/Streptomycyny. Następnie przefiltowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22  $\mu\text{m}$ , przechowywano w lodówce.

- Medium do mrożenia komórek (Cryo-SFM, nr kat. C-29910, PromoCell)
- PBS (nr kat. P4417, Sigma)
- FBS (Fetal Bovine Serum, nr kat. S1810-500, Biowest, Nuaille, Francja)
- Trypsyna/EDTA (nr kat. L0930, Biowest)
- Roztwór neutralizujący trypsynę (Trypsin neutralization solution, nr kat. PCS-999-004, ATCC, Manassas, USA)

### *Postępowanie*

Hodowlę komórkową HCM przeprowadzono zgodnie z procedurą:

#### 1. Opłaszczanie butelek hodowlanych:

- a. Poly-L-lizynę rozcieńczono 7-krotnie sterylną wodą dejonizowaną, powstały roztwór rozprowadzono po całej powierzchni butelki hodowlanej.
- b. Butelkę inkubowano w 37°C przez noc.
- c. Usunięto roztwór i 2-krotnie przepłukano butelkę sterylną wodą dejonizowaną.
- d. Butelki pozostawiono do wyschnięcia w 37°C przez noc.

#### 2. Zakładanie hodowli:

- a. Do butelki hodowlanej (T-25  $\text{cm}^2$ ) opłaszczonej poly-L-lizyną dodano 5 ml medium hodowlanego i umieszczono w cieplarni na 10–15 minut.

- b. Fiolkę z HCM wyciągnięto z ciekłego azotu i ogrzewano w łaźni wodnej w 37°C do rozmrożenia.
- c. Zawartość fiolki dokładnie wymieszano przy użyciu pipety i ostrożnie przeniesiono do butelki hodowlanej z wcześniej ogrzanym medium, delikatnie zmieszano.
- d. Butelkę inkubowano w cieplarni, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w 37°C przez minimum 16 godzin.
- e. Wymieniono medium hodowlane, butelki inkubowano w cieplarni w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w 37°C do uzyskania 90% konfluencji, medium hodowlane wymieniano co 2 dni.

### 3. Pasażowanie komórek:

- a. Do dwóch butelek (T-75 cm<sup>2</sup>), opłaszczonych poly-L-lizyną, napipetowano 10 ml medium. Butelki ogrzano w 37°C.
- b. Usunięto medium hodowlane z butelki z komórkami (T-25 cm<sup>2</sup>) do falkonu, do medium dodano 2 ml FBS.
- c. Butelkę z komórkami przepłukano 2 ml PBS, PBS usunięto.
- d. Do butelki z komórkami dodano 2 ml trypsyny, rozprowadzono po całej powierzchni i wstawiono do cieplarki na 3 minuty.
- e. Pod mikroskopem sprawdzono, czy komórki uległy trypsynizacji.
- f. Mieszaninę trypsyny i komórek przeniesiono do falkonu zawierającego medium i FBS.
- g. Butelkę przepłukano 2 ml świeżej porcji medium, medium również przeniesiono do falkonu.
- h. Falkon uzupełniono świeżym medium do 15 ml i odwirowano 155 × g przez 3 minuty.
- i. Nadsącz usunięto, pellet komórkowy rozprowadzono w 1 ml świeżego medium i przeniesiono po 0,5 ml komórek, zawieszonych w medium, do butelek (T-75 cm<sup>2</sup>) z wcześniej ogrzanym medium hodowlanym.
- j. Następnego dnia zmieniono medium hodowlane, butelki inkubowano w cieplarni w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w 37°C do uzyskania 90% konfluencji, medium hodowlane wymieniano co 2 dni.
- k. Po uzyskaniu 90% konfluencji i trypsynizacji:

- W celu dalszego prowadzenia hodowli komórkowej komórki przepasażowano do kolejnych butelek (T-75 cm<sup>2</sup>) (zgodnie z procedurą opisaną w punktach 3a–3j, dostosowując objętość odczynników do powierzchni butelki).
- W celu poddania komórek procedurze chemicznego niedokrwienia i reperfuzji komórki zliczono przy użyciu EVE Automatic Cell Counter i przepasażowano na 12-dołkowe płytki hodowlane, tak aby uzyskać taką samą liczbę komórek w dołkach. Komórki hodowano do uzyskania 90% konfluencji i poddano procedurze opisanej w punkcie 2.3.

### 2.3. Procedura chemicznego niedokrwienia i reperfuzji (I/R)

*Aparatura i wyposażenie:*

- Karbogen
- Wielofunkcyjny czytnik płytek Spark (TECAN, Männedorf, Szwajcaria)
- Automatyczne pipety miarowe

*Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **Bufor HEPES (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,6 mM glukoza, 10 mM tauryna, 5 mM HEPES, pH 7,4):**  
0,3535 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,0187 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR), 0,0102 g MgCl<sub>2</sub> (nr kat. 363-116120500, CHEMPUR), 0,05 g glukozy (nr kat. 114595600, CHEMPUR), 0,0625 g tauryny (nr kat. T0625, Sigma-Aldrich) i 0,0655 g HEPES (nr kat. H7006, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl, natleniono karbogenem.
- **1 M CaCl<sub>2</sub>**  
1,47 g CaCl<sub>2</sub> (nr kat. 118748706, CHEMPUR) rozpuszczono w 10 ml H<sub>2</sub>O.
- **Bufor F (14,8 mM BSA)**  
150 mg BSA (nr kat. A3294, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 50 ml buforu HEPES z dodatkiem 5 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>.

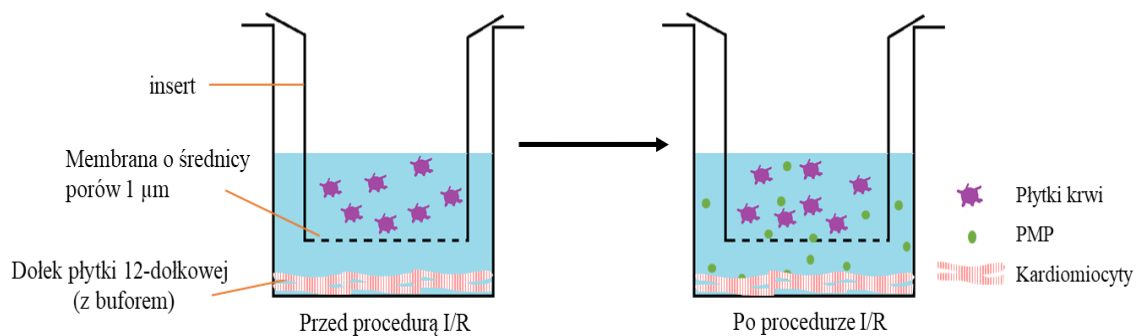
- **Bufor do hipoksji (stock 100 x)**

0,1 g NaCN (nr kat. 380970, Sigma-Aldrich) i 0,4 g glukozy (nr kat. 114595600, CHEMPUR) rozpuszczono w 5 ml wody dejonizowanej. Przed użyciem rozcieńczono 100-krotnie buforem F.

- **PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)**

4,1 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,1 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR), 0,71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (nr kat. 21.988-6, Sigma-Aldrich) oraz 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nr kat. 1331-11-742020-2, POCH) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.

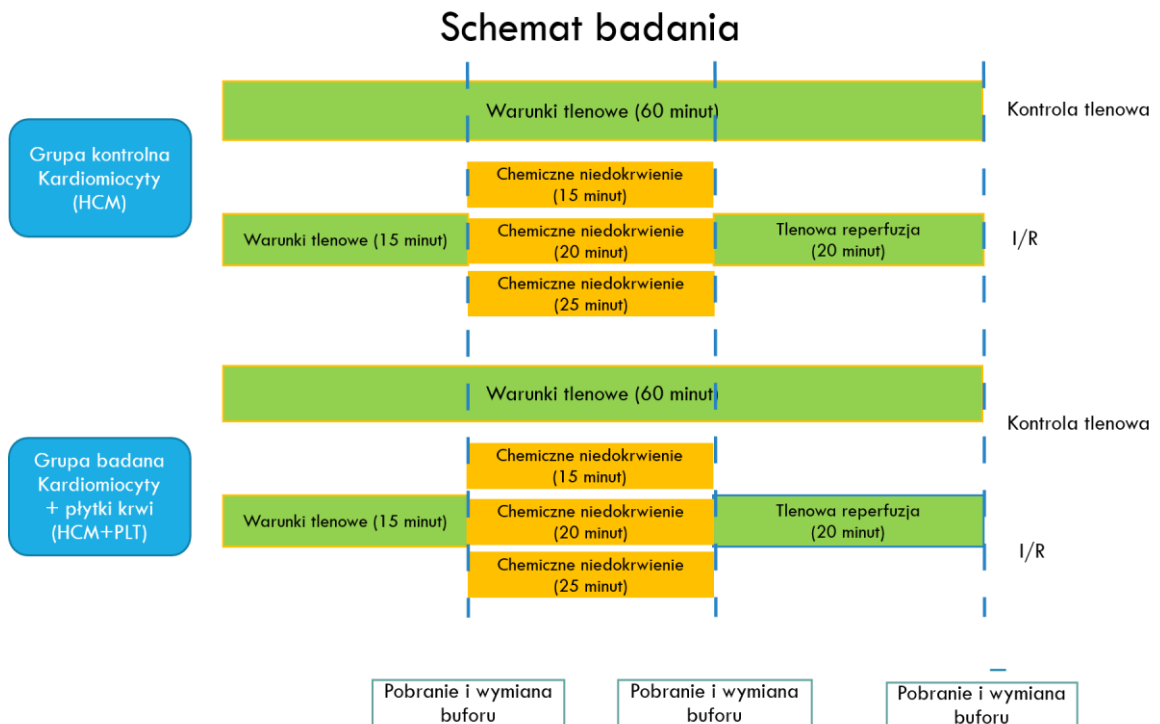
Procedura chemicznego I/R została przeprowadzona z użyciem 12-dółkowych płytek hodowlanych i dedykowanych do nich insertów o średnicy porów 1,0 μm. Wyizolowane płytki krwi umieszczono w insertach, HCM – w dołkach, co zaprezentowano na rycinie 4.



**Rycina 4. Schemat rozmieszczenia komórek podczas procedury I/R z zastosowaniem insertów oraz migracji PMP przez membranę insertu. PMP – mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego.**

Procedura obejmowała grupę kontrolną, którą stanowiły jedynie HCM oraz grupę badaną, którą stanowiły HCM skontaktowane z płytkami krwi. W obu grupach przeprowadzono procedurę I/R oraz kontrolę tlenową. Procedura I/R składała się z trzech

etapów: stabilizacji, niedokrwienia i reperfuzji. Przebieg procedury zilustrowano na schemacie przedstawionym poniżej (rycina 5).

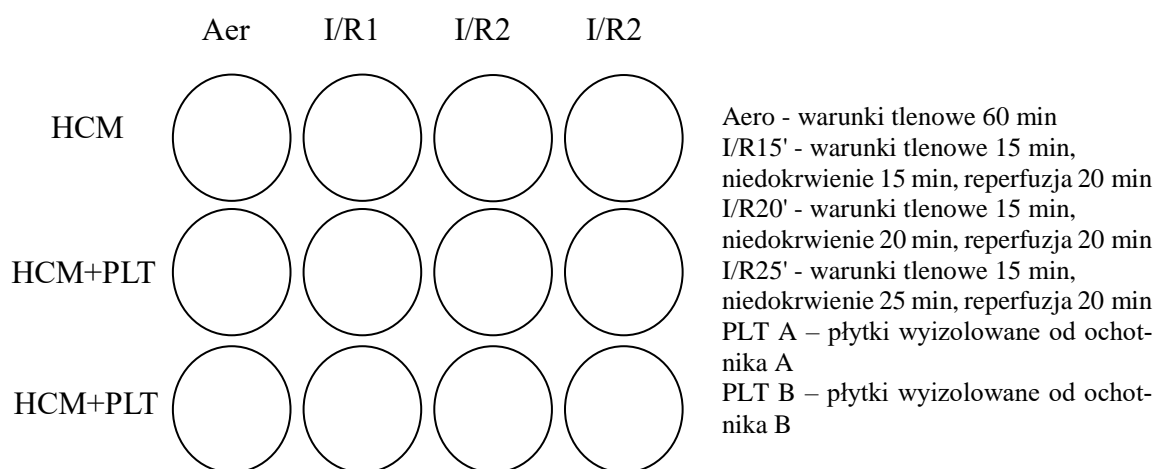


**Rycina 5. Schemat badania eksperymentalnego. HCM – kardiomiocyty, PLT – płytki krwi, I/R – niedokrwienie i reperfuzja.**

Płytki krwi oraz kardiomiocyty poddano chemicznemu I/R zgodnie z procedurą:

1. Komórki HCM w dołkach płytki 12-dołkowej przepłukano 3-krotnie 0,5 ml PBS.
2. Zmierzono konfluencję HCM w każdym z dołków 12-dołkowej płytki hodowlanej przy pomocy czytnika Spark Tecan.
3. W dołkach płytki umieszczono inserty. W grupie badanej, do insertów napipetowano wyizolowane płytki krwi w liczbie po  $2 \times 10^8$  na insert.

Przykładowy schemat 12-dołkowej płytki hodowlanej, na której przeprowadzono procedurę I/R przedstawiono poniżej (rycina 6).



**Rycina 6. Przykładowa płytki 12-dołkowa do procedury I/R.**

4. Do dołków dodano:

- a) po 1 ml natlenionego buforu F – warunki tlenowe Aero,
- b) po 1 ml natlenionego buforu F – stabilizacja I/R.

Inkubowano 15 minut.

5. Bufory zebrano z dołków płytki i zamrożono w probówkach typu eppendorf w  $-80^{\circ}\text{C}$  w celu wykonania dalszych analiz.

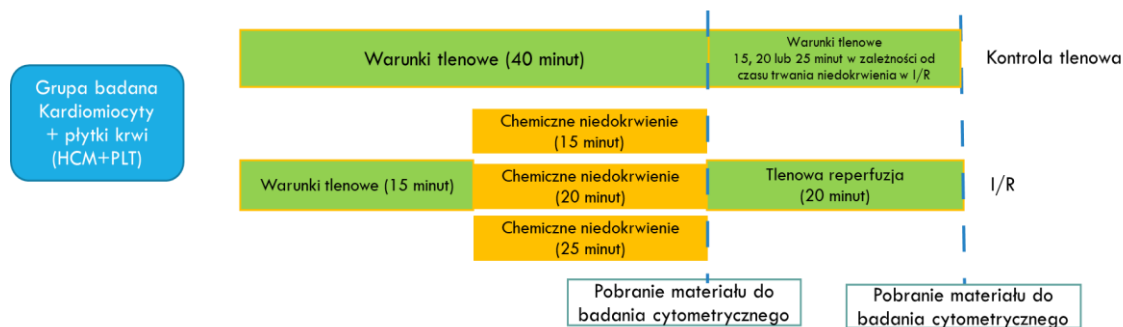
6. Do dołków dodano:

- a) po 1 ml natlenionego buforu F – warunki tlenowe Aero,
- b) po 1 ml buforu do hipoksji – niedotlenienie, warunki I/R.

Inkubowano odpowiednio: 15 minut, 20 minut oraz 25 minut.

7. Bufory z dołków zebrano i zamrożono w probówkach typu eppendorf w  $-80^{\circ}\text{C}$  w celu wykonania dalszych analiz. Pobrano po 100  $\mu\text{l}$  izolowanych płytek krwi z każdego insertu do badania cytometrycznego zgodnie ze schematem przedstawionym poniżej (rycina 7).





**Rycina 7. Schemat pobierania materiału do badania cytometrycznego płytek krwi.**

8. Komórki HCM we wszystkich dołkach przepłukano 3-krotnie 0,5 ml PBS.
9. Do odpowiednich dołków dodano:
  - a) po 1 ml natlenionego buforu F – warunki tlenowe Aero
  - b) po 1 ml natlenionego buforu F – reperfuzja I/R

Inkubowano 20 minut.

10. Bufory z dołków zebrano i zamrożono w probówkach typu eppendorf w  $-80^{\circ}\text{C}$  w celu wykonania dalszych analiz.
11. Płytki krwi zebrano z insertów w celu wykonania badania cytometrii przepływowej (rycina 7) lub zwirowano przy użyciu siły  $600 \times g$  przez 2 minuty. Uzyskany pellet zamrożono w probówkach typu eppendorf w  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.
12. Komórki HCM we wszystkich dołkach przepłukano 2-krotnie PBS. Zmierzono konfluencję HCM w każdym z dołków 12-dołkowej płytki hodowlanej przy pomocy czytnika Spark Tecan. Następnie komórki analizowano przy użyciu barwienia FDA/DAPI metodą immunofluorescencji lub poddano trypsynizacji i wirowaniu celem uzyskania pelletu, który zamrożono w probówkach typu eppendorf w  $-80^{\circ}\text{C}$  do wykonania dalszych analiz.

## 2.4. Barwienie FDA/DAPI

*Aparatura i wyposażenie:*

- Mikroskop fluorescencyjny OLYMPUS IX53 wraz z oprogramowaniem CellSens Entry
- Program ImageJ

- Automatyczne pipety miarowe

#### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **FDA (Fluorescein diacetate, nr kat. F7378, Sigma-Aldrich)**

1 mg FDA rozpuszczono w 1 ml acetonu, wytrząsnięto, zabezpieczono aluminiową folią. Przygotowano roztwór roboczy przez dodanie 30  $\mu$ l roztworu FDA do 10 ml buforu PBS.

- **DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, nr kat. 10236276001 Sigma-Aldrich)**

Z roztworu wyjściowego o stężeniu 14,3 mM przygotowano roztwór 300  $\mu$ M DAPI przez rozcieńczenie 2,1  $\mu$ l 14,3 mM DAPI w 100  $\mu$ l PBS, a następnie przechowywano w lodówce. Przygotowano roztwór roboczy przez rozcieńczenie 10  $\mu$ l 300  $\mu$ M DAPI w 10 ml buforu PBS.

- **PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)**

4,1 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,1 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR), 0,71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (nr kat. 21.988-6, Sigma-Aldrich) oraz 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nr kat. 1331-11-742020-2, POCH) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.

#### *Postępowanie*

Barwienie FDA/DAPI kardiomiocytów, bezpośrednio po procedurze I/R, przeprowadzono zgodnie z procedurą:

1. Po zmierzeniu konfluencji z dołków delikatnie odpipetowano PBS.
2. Do dołków dodano po 500  $\mu$ l roztworu roboczego FDA.
3. Inkubowano przez 15 minut w ciemności.
4. Roztwór FDA delikatnie odpipetowano, komórki przepłukano 2-krotnie 500  $\mu$ l PBS.
5. Do dołków dodano po 500  $\mu$ l roztworu roboczego DAPI.
6. Inkubowano przez 12 minut w ciemności.
7. Płukano 2-krotnie 500  $\mu$ l PBS.

8. Wykonano po 3 zdjęcia w kanale niebieskim (świecenie DAPI) i zielonym (świecenie FDA) każdego dołka przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego OLYMPUS IX53 i programu CellSens Entry.
9. Zdjęcia analizowano przy pomocy programu ImageJ.
10. Aktywność metaboliczną kardiomiocytów wyliczono jako iloraz fluorescencji FDA do sumy fluorescencji FDA i DAPI.

## 2.5. Immunofluorescencja

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Mikroskop fluorescencyjny ZOE (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Program ImageJ
- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)**

4,1 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,1 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR), 0,71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (nr kat. 21.988-6, Sigma-Aldrich) oraz 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nr kat. 1331-11-742020-2, POCH) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.

- **4% paraformaldehyd**

4 mg paraformaldehydu (nr kat. P-6148, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 100 ml PBS ogrzewając. 4 % paraformaldehyd przechowywano w -20°C.

- **Bufor blokujący**

0,2 g BSA (nr kat. A3294, Sigma-Aldrich), 0,45 g glicyny, 0,02 ml Tween (nr kat. P1379, Sigma-Aldrich), 2 ml Goat serum (nr kat. G9023, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 18 ml buforu PBS.

- **1% BSA**

0,15 g BSA (nr kat. A3294, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 15 ml PBS.

- **0,2% BSA**

0,03 g BSA (nr kat. A3294, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 15 ml PBS.

- **Przeciwciała**

- Królicze przeciwciała anty-iNOS (nr kat. Ab 15323, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania),
- Ośle przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko króliczym przeciwciałom IgG, znakowane DyLight 488 (nr kat. 98488, Abcam).

### *Postępowanie*

Badanie ekspresji białek iNOS w kardiomiocytach przeprowadzono na płytkach 12-dołkowych tuż po zakończeniu procedury I/R, metodą immunofluorescencji pośredniej, jak przedstawiono poniżej:

1. Kardiomiocyty utrwalono przez dodanie do dołków po 500 µl 4% paraformaldehydu.
2. Komórki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej.
3. Dołki z HCM przepłukano 3-krotnie 500 µl buforu PBS.
4. Do dołków dodano po 500 µl buforu blokującego.
5. Inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
6. Dołki z HCM przepłukano 3-krotnie 500 µl buforu PBS.
7. Do dołków dodano po 500 µl przeciwciał I-rzędowych: anty-iNOS rozcieńczonych odpowiednio w stosunku 1:200 przy użyciu 1% BSA.
8. Komórki z przeciwciałami inkubowano przez noc w temperaturze 4°C.
9. Dołki z HCM przepłukano 3-krotnie 500 µl buforu PBS.
10. Do dołków dodano po 500 µl przeciwciał II-rzędowych: oślich przeciwciał anty-króliczych rozcieńczonych w stosunku 1:200 przy użyciu 0,2% BSA.
11. Komórki z przeciwciałami inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej w ciemności.
12. Dołki z HCM przepłukano 3-krotnie 500 µl buforu PBS.
13. Do dołków dodano po 500 µl DAPI.

14. Inkubowano przez 15 minut w ciemności.
15. Dołki z HCM przepłukano 3-krotnie 500 µl buforu PBS, poddano analizie.
16. Wykonano po 3 zdjęcia w kanale niebieskim (fluorescencja DAPI) i zielonym (fluorescencja koniugatu dla iNOS) każdego dołka przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego ZOE (Bio-Rad).
17. Zdjęcia analizowano przy pomocy programu ImageJ.
18. Ekspresję iNOS w kardiomiocytach wyliczono jako iloraz pomiaru fluorescencji iNOS do fluorescencji DAPI.

## 2.6. Badanie cytometryczne płytek krwi

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Cytometr przepływowy Sysmex CyFlow Space (Sysmex)

Ocenę cytofluorymetryczną płytek przeprowadzono w Pracowni Przesiewowych Testów Aktywności Biologicznej i Gromadzenia Materiału Biologicznego Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z wykorzystaniem cytometru przepływowego CyFlow® Space (Sysmex, Japonia) współfinansowanego ze środków EFRR POiŚ.02.01.00-14- 122/09.

- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)**

4,1 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,1 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR), 71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (nr kat. 21.988-6, Sigma-Aldrich) oraz 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nr kat. 1331-11-742020-2, POCH) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.

- **1% paraformaldehyd**

0,5 g paraformaldehydu (nr kat. P-6148, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 50 ml PBS, ogrzewając.

- **Stain Buffer (nr kat. 554656, BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA)**

- **Przeciwciała znakowane**

- Anty-ludzkie CD62P, znakowane PE (nr kat. 304906, BioLegend, San Diego, USA),
- Anty-ludzkie CD63, znakowane PE-Cy7 (nr kat. 353010, BioLegend),
- Anty-CD41/CD61, klon PAC-1, znakowane FITC (nr kat. 362804, BioLegend),

- **Kontrole izotypowe**

- FITC Mouse IgM Isotyp Ctrl (nr kat. 401606, BioLegend),
- PE Mouse IgG1 Isotyp Ctrl (nr kat. 400112, BioLegend),
- PE-Cy7 Mouse IgM Isotyp Ctrl (nr kat. 400126, BioLegend),

### *Postępowanie*

Próbki do badania cytometrycznej ekspresji receptorów powierzchniowych płytek krwi przygotowano zgodnie z procedurą:

1. 100  $\mu$ l wyizolowanych płytek krwi pobrano z insertów po etapie niedokrwienia i reperfuzji (I/R) oraz po odpowiadających im czasach w warunkach tlenowych i natychmiast wstrzyknięto do 1 ml zimnego 1% paraformaldehydu.
2. Inkubowano 30 minut.
3. Dodano 1 ml PBS i wirowano z siłą  $1200 \times g$  przez 5 minut.
4. Supernatant odrzucono, płytki krwi zawieszono w 60  $\mu$ l Stain Buffer.
5. Do czystych probówek cytometrycznych napipetowano po 2,5  $\mu$ l znakowanych przeciwciał lub kontroli izotypowych.
6. Do probówek z przeciwciałami i kontrolami izotypowymi dodano po 25  $\mu$ l utrwalonych płytek krwi.
7. Inkubowano przez 20 minut w ciemności.
8. Dodano 1 ml PBS, zworteksowano i odwirowano z siłą  $1200 \times g$  przez 5 minut.
9. Supernatant odrzucono. Pellet zawieszono w 1 ml filtrowanego PBS.
10. Próbki poddano analizie na cytometrze przepływowym Sysmex CyFlow Space do dwóch godzin od przygotowania.

## 2.7. Badanie cytometryczne mikrocząstek pochodzenia płytkowego

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Cytometr przepływowy CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, USA)
- Mikro-ultrawirówka Sorvall MTX 150 (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4)**

4,1 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,1 g KCl (nr kat. 117397402, CHEMPUR), 0,71 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (nr kat. 21.988-6, Sigma-Aldrich) oraz 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nr kat. 1331-11-742020-2, POCH) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 roztworem HCl o stężeniu 35%.

- **Stain Buffer (nr kat. 554656, BD Pharmingen)**
- **Przeciwciała znakowane**
  - Anty- ludzkie CD41/CD61, klon PAC-1, znakowane FITC (nr kat. 362804, BioLegend),
  - Anty- ludzkie CD61, znakowane PE (nr kat. 555754, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).
- **CytoFLEX Daily QC Fluoroshperes (nr kat. B53230, Beckman Coulter)**
- **Apogee Mix (nr kat. 1493, ApogeeFlow, Hemel Hempstead, Wielka Brytania)**

### *Postępowanie*

Ze względów technicznych badanie cytometryczne PMP przeprowadzono przy użyciu CD61 i aktywowanej GP IIb-IIIa (klon PAC-1). Próbkę do badania cytometrycznego PMP przygotowano zgodnie z procedurą:

1. Bufory zebrane po etapie niedokrwienia oraz po odpowiadających im czasach w warunkach tlenowych zwirowano w próbkach typu eppendorf przy sile odśrodkowej  $2500 \times g$  przez 20 minut.

2. Odpipetowano supernatant. Do supernatantu dodano 100  $\mu$ l Stain Buffer.
3. Do czystych probówek do ultrawierowania dodano po 150  $\mu$ l przygotowanego supernatantu oraz po 1  $\mu$ l przeciwciał. Inkubowano przez 30 minut w ciemności.
4. Dodano 900  $\mu$ l PBS i ultrawierowano 50000  $\times$  g przez 90 minut.
5. Supernatant ostrożnie odpipetowano zostawiając w probówce 200  $\mu$ l i dodano 200  $\mu$ l PBS. Próbkę poddano analizie na cytometrze przepływowym CytoFLEX.

## 2.8. Trypsynizacja komórek HCM z płytek 12-dołkowych

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Filtry strzykawkowe z membraną o średnicy porów 0,22  $\mu$ m (nr kat. 6-0047, Bionovo)
- Wirówka laboratoryjna MIKRO 120 (Hettich, Kirchlengern, Niemcy)
- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- Trypsyna/EDTA (nr kat. L0930, Biowest, Bradenton, USA)
- Penicylina/Streptomycyna (nr kat. P0781, Sigma-Aldrich) o stężeniu 10000 U penicyliny i 10 mg streptomycyny/ml w 0,9% NaCl
- Medium hodowlane (Myocyte Growth Medium (Ready-to-use) ) wraz z Supplement Mix (nr kat. C-22070, PromoCell)

500 ml medium hodowlanego (Myocyte Growth Medium) zmieszano z 25,4 ml suplementu (Myocyte Growth Medium Supplement Mix) i dodano 5 ml Penicyliny/Streptomycyny. Następnie przefiltowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22  $\mu$ m, przechowywano w lodówce.

### *Postępowanie*

Trypsynizację komórek HCM z płytek 12-dołkowych przeprowadzono zgodnie z procedurą:

1. Do dołków dodano po 0,3 ml trypsyny/EDTA.
2. Płytkę inkubowano przez 2 minuty w ciepłarni do momentu trypsynizacji komórek.



3. Komórki zawieszona w trypsynie/EDTA przeniesiono do opisanych probówek typu eppendorf.
4. Do dołków dodano po 0,3 ml medium hodowlanego, następnie medium przeniesiono do probówek typu eppendorf zawierających trypsynę i komórki.
5. Eppendorfy odwirowano z siłą  $1500 \times g$  przez 2 minuty.
6. Nadsącz odrzucono, do pelletu dodano 0,2 ml medium, delikatnie wymieszano.
7. Eppendorfy odwirowano z siłą  $1500 \times g$  przez 2 minuty.
8. Supernatant odrzucono, pellet zamrożono w  $-80^{\circ}\text{C}$  celem wykonania następných analiz.

## 2.9. Homogenizacja

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Homogenizator ręczny Pellet Pestle® Motor (Kimble Kontes, Vineland, USA)
- Wirówka laboratoryjna MIKRO 120 (Hettich, Kirchleugern, Niemcy)
- Ciekły azot
- Termoblok Bio TDB-100 (BioSan, Warren, USA)
- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **50 mM Tris (pH 7,4)**  
0,6057 g Trisma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,4 przy użyciu HCl o stężeniu 35%.
- **150 mM NaCl**  
0,8766 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH) rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej.
- **Bufor do homogenizacji izolowanych płytek krwi**  
0,9 g 150 mM NaCl (nr kat. BA4121116, POCH), 0,61 g 50 mM Tris oraz 0,1 g Triton X-100 (nr kat. X-100, Sigma-Aldrich) zmieszano i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100 ml.

- **2 M Tris (pH 7,6)**  
12 g Trisma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,6 przy użyciu HCl o stężeniu 35%.
- **10% Triton**  
1 ml Triton X-100 (nr kat. X-100, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 9 ml wody dejonizowanej.
- **Bufor do homogenizacji kardiomiocytów**  
2,5 ml 2 M Tris, 0,876 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH) oraz 0,91 ml 10% Triton rozpuszczono i uzupełniono wodą dejonizowaną do 100 ml.

### *Postępowanie*

Homogenizację pelletów płytek krwi i kardiomiocytów przeprowadzono zgodnie z procedurą:

1. Do probówek typu eppendorf zawierających pellety płytek krwi dodano 79,2  $\mu$ l buforu do homogenizacji płytek krwi oraz 0,8  $\mu$ l mieszaniny inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich) (stosunek objętościowy 1:100), próbki dokładnie wymieszano przez aspirację.
2. Do probówek typu eppendorf zawierających pellety kardiomiocytów dodano 89,1  $\mu$ l buforu do homogenizacji kardiomiocytów oraz 0,9  $\mu$ l mieszaniny inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich) (stosunek objętościowy 1:100), próbki dokładnie wymieszano przez aspirację.
3. Komórki poddano trzem cyklom zamrażania w ciekłym azocie i rozmrażania w temperaturze 37°C.
4. Komórki trzykrotnie zhomogenizowano mechanicznie przez zastosowanie homogenizatora ręcznego, na lodzie, przez 10 sekund, z przerwami 20 sekund między cyklami.
5. Uzyskane homogenaty komórkowe odwirowano przez 5 minut przy  $17530 \times g$ .
6. Supernatanty po odwirowaniu przeniesiono do nowych probówek typu eppendorf i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  celem wykonania kolejnych oznaczeń.

## 2.10. Zymografia żelatynowa

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Aparat Mini-Protean II (Bio-Rad)
- Skaner GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad)
- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **30% akrylamid**  
14,6 g akrylamidu (nr kat. A9099, Sigma-Aldrich) i 0,4 g N’N’-metylenobisakrylamidu (nr kat. 66669, Fluka, Buchs, Szwajcaria) rozpuszczono w 50 ml wody dejonizowanej.
- **1,5 M Tris/HCl, pH 8,8**  
18,171 g Trisma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 8,8 roztworem HCl o stężeniu 35%.
- **0,5 M Tris/HCl, pH 6,8**  
6,057 g Trisma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 6,8 roztworem HCl o stężeniu 35%.
- **10% SDS (nr kat. 796630425, POCH)**  
10 g SDS uzupełniono wodą dejonizowaną do 100 ml.
- **2% żelatyna w 1 % SDS**  
1 g żelatyny ze skóry świni (nr kat. G2625, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 5 ml 10% SDS i 45 ml wody dejonizowanej.
- **Bufor do próbek: 4 x Laemml Sample Buffer (nr kat. #1610747, Bio-Rad)**
- **APS (nr kat. #161-0700, Bio-Rad)**
- **TEMED (nr kat. #161-0801, Bio-Rad)**
- **Bufor do elektroforezy, stężony 10-krotnie (0,25 M Tris/HCl, 2 M glicyna, pH 8,3)**  
30,3 g Trisma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich), 144 g glicyny (nr kat. 115275608, CHEMPUR), 10 g SDS (nr kat. 796630425, POCH) rozpuszczono w 1000 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 8,3 roztworem HCl o stężeniu 35%.  
Przed użyciem bufor rozcieńczono 10-krotnie wodą dejonizowaną, schłodzono w lodówce.

- **2,5% Triton X-100 (nr kat. X-100, Sigma-Aldrich)**  
25 ml Triton zmieszano z 975 ml wody dejonizowanej.
- **Bufor do inkubacji (0,05 M Tris/HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 M NaCl, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,5)**  
3,03 g Trisma Base (nr kat. 93352, Sigma-Aldrich), 0,27 g CaCl<sub>2</sub> (nr kat. 118748706, CHEMPUR), 5,8 g NaCl (nr kat. BA4121116, POCH) oraz 0,25 g NaN<sub>3</sub> (nr kat. 13412, Riedel-de Haën, Honeywell, Charlotte, USA) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej i doprowadzono do pH 7,5 roztworem HCl o stężeniu 35%. Bufor przygotowano tuż przed użyciem.
- **Odczynnik barwiący (0,4% CBB R-250, 0,1% CBB G-250)**  
2 g CBB R-250 (nr kat. 821636, MP Biomedicals, Santa Ana, USA) oraz 0,5 g CBB G-250 (nr kat. 190343, ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA) rozpuszczono w 500 ml odczynnika odbarwiającego.
- **Odczynnik odbarwiający**  
300 ml metanolu (nr kat. 603-001-00-X, Reiden-de Haën) oraz 100 ml kwasu octowego (nr kat. 568760114, POCH) zmieszano z 600 ml wody dejonizowanej.

### *Postępowanie*

Zymografię żelatynową przeprowadzono zgodnie z procedurą:

1. Przygotowano żele:

7,5% żel dolny, rozdzielający, objętości na 1 żel:

Odczynnik	Objętość
H <sub>2</sub> O	2 ml
Żelatyna ze skóry świni	0,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	1,25 ml
30% akrylamid	1,25 ml
APS	33,4 µl
TEMED	6,7 µl

Żel górny, zagęszczający, objętości na 1 żel:

Odczynnik	Objętość
H <sub>2</sub> O	1,4 ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	625 µl
30% akrylamid	328 µl
10% APS	25 µl
TEMED	8 µl
10% SDS	25 µl

2. Próbkę zmieszano w stosunku objętościowym 3:1 z buforem do próbek (30 µl próbki + 10 µl buforu do próbek) i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 minut do pełnej denaturacji białek.
3. Następnie naniesiono po 35 µl mieszaniny do studzienek żelu zagęszczającego.
4. Przeprowadzono elektroforezę w aparacie Mini-Protean II w buforze do elektroforezy (1 x) w temperaturze 4°C, przez około 2 godziny, pod napięciem 100 V.
5. Po zakończeniu elektroforezy żełe płukano trzykrotnie w 100 ml 2,5% Triton X-100 przez 15–20 minut, łagodnie mieszając na kołyszce.
6. Żele inkubowano w buforze do inkubacji przez 18 godzin w temperaturze 37°C.
7. Po inkubacji, żełe barwiono w odczynniku barwiącym przez 1–2 godziny, łagodnie mieszając na kołyszce.
8. Następnie żełe odbarwiano przez 1,5 godziny w trzech porcjach odczynnika odbarwiającego.
9. Żele zeskanowano przy użyciu skanera Bio-Rad GS-800 Calibrated Densitometer. Przyjęto, że pole powierzchni pasma aktywnej formy MMP-9 i MMP-2 oraz formy latentnej MMP-2 supernatantu HT 1080 odpowiada 100 jednostkom arbitralnym (AU). Pole powierzchni żelatynaz analizowanych w płytkach krwi, kardiomiocytach oraz supernatantach po niedokrwieniu i reperfuzji przeliczono w stosunku do pola powierzchni względnego standardu i podano w AU. Wyniki znormalizowano w oparciu o stężenie białka całkowitego w każdej z próbek, oznaczonego w sposób opisany w 2.11.

## 2.11. Oznaczanie białka metodą Bradforda

### *Aparatura i wyposażenie:*

- Wielofunkcyjny czytnik płytek Spark (TECAN, Männedorf, Szwajcaria)
- Płytki 96-dołkowe (nr kat. 442404, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Automatyczne pipety miarowe

### *Odczynniki i ich przygotowanie:*

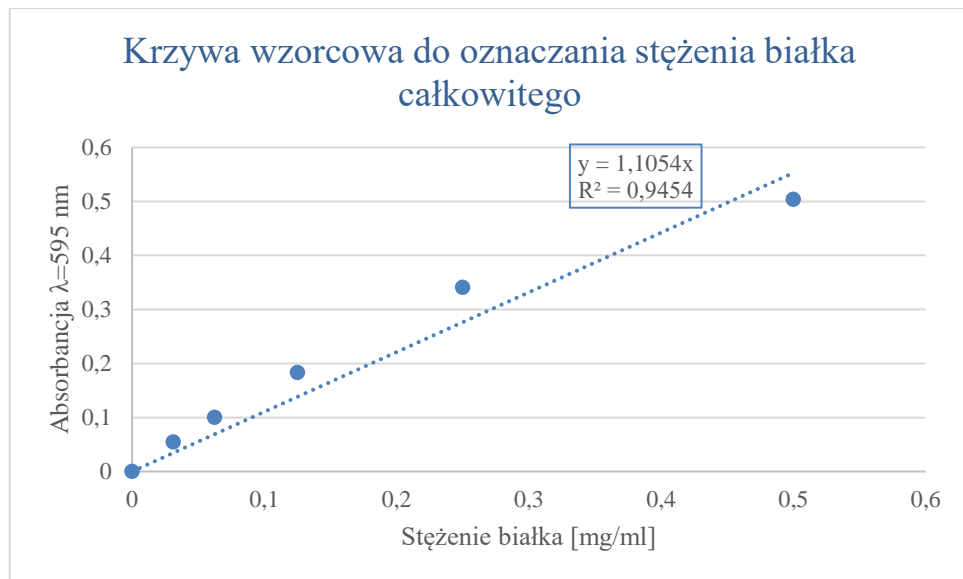
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (nr kat. #500-0006, Bio-Rad)

Przed użyciem odczynnik rozcieńczono wodą dejonizowaną w proporcji: 1 porcja odczynnika na 4 porcje wody dejonizowanej. Chroniono przed światłem przy użyciu foli aluminiowej.

- BSA (nr kat. A3294, Sigma-Aldrich) – wzorzec stężenia białka

### *Postępowanie*

1. W celu wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowano rozcieńczenia wzorca o stężeniu: 0,0 mg/ml, 0,03125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml oraz 0,50 mg/ml. Rozcieńczenia wzorca oznaczono w dwóch powtórzeniach dodając do 200  $\mu$ l odczynnika Bradforda po 10  $\mu$ l rozcieńczeń. Inkubowano 5 minut. Odczyt absorbancji na wielofunkcyjnym czytniku płytek Spark wykonano przy długości fali  $\lambda$  595 nm. Odczyt absorbancji dla poszczególnych rozcieńczeń wzorca został pomniejszony o wartość absorbancji dla próby ślepej (stężenie wzorca 0,0 mg/ml). Wykreślono krzywą wzorcową (wykres 1).



**Wykres 1. Krzywa wzorcowa, równanie krzywej oraz współczynnik determinacji do oznaczania białka metodą Bradforda.**

- Próbki oznaczono w dwóch powtórzeniach dodając po 10  $\mu$ l próbki do 200  $\mu$ l odczynnika Bradforda. Inkubowano 5 minut. Odczyt absorbancji na wielofunkcyjnym czytniku płytek Spark wykonano przy długości fali  $\lambda$  595 nm. Odczyt absorbancji wszystkich próbek został pomniejszony o wartość absorbancji dla próbki ślepej, następnie stężenie białka w próbkach obliczono na podstawie krzywej wzorcowej.

## 2.12. Izolacja RNA z płytek krwi i kardiomiocytów

*Odczynniki i ich przygotowanie:*

- Trizol™ Reagent (nr kat. 15596026, Invitrogen, Waltham, USA)
- Chloroform (nr kat. 67-66-3, P. P. H „Stanlab”, Lublin, Polska)
- Izopropanol (nr kat. 617515006, Chempur)
- Etanol (nr kat. 113964200, Chempur)
- Woda DEPC-Treated (nr kat. AM9906, Ambion, Austin, USA)

Materiał genetyczny uzyskano z wyizolowanych płytek krwi oraz kardiomiocytów zamrożonych po etapie niedokrwienia i reperfuzji (I/R). Izolację i oczyszczenie RNA przez dwufazową ekstrakcję RNA przeprowadzono zgodnie z procedurą:

1. Do pelletów płytek krwi i kardiomiocytów dodano 800  $\mu$ l Trizolu, próbki zhomogenizowano przez aspirację i ręczne wytrząsanie.
2. Do próbek dodano 160  $\mu$ l chloroformu (w stosunku objętościowym chloroformu do trizolu wynoszącym 1:5), wytrząsano ręcznie przez 15 sekund, inkubowano 1–2 minuty w temperaturze pokojowej do momentu rozdzielenia faz.
3. Próbki odwirowano z siłą  $12\ 000 \times g$  przez 15 minut w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Fazę wodną (górną) przeniesiono do nowych probówek typu eppendorf.
5. Do probówek dodano taką samą objętość izopropanolu, wytrząsano ręcznie przez 15 sekund i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut.
6. Próbki odwirowano z siłą  $12\ 000 \times g$  przez 15 minut w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ .
7. Supernatanty odrzucono.
8. Do pelletu RNA dodano 1ml 70% etanolu, wymieszano przez kilkukrotne odwrócenie próbki.
9. Próbki odwirowano z siłą  $7\ 500 \times g$  przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
10. Supernatanty odrzucono.
11. Pellety RNA pozostawiono do wyschnięcia w  $37^{\circ}\text{C}$  w bloku grzejnym przez około 10–15 minut, tak aby nie doszło do ich przesuszenia.
12. RNA rozpuszczono w 20  $\mu$ l wody DEPC.
13. Próbki zamrożono w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu odwrotnej transkrypcji.

### 2.13. Odwrotna transkrypcja

*Aparatura i wyposażenie:*

- **Probówki o objętości 0,2 ml (nr kat. TLS0801, Bio-Rad, nr kat. TCS0803, Bio-Rad)**
- **Automatyczne pipety miarowe**
- **Termocykler CFX96 Touch Real-Time System (Bio-Rad)**

*Odczynniki i ich przygotowanie:*

- **-iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit (nr kat.170-8890, Bio-Rad)**
- **Woda DEPC-Treated (nr kat. AM9906, Ambion, Austin, USA)**



### *Postępowanie*

Proces odwrotnej transkrypcji RNA wyizolowanego z płytek krwi i kardiomiocytów, przy użyciu odwrotnej transkryptazy przeprowadzono zgodnie z procedurą:

1. Próbkki uzyskane po izolacji RNA rozmrożono i wymieszano.
2. Zmierzono ilość i czystość RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, Watham, USA).
3. Proces odwrotnej transkrypcji przeprowadzono wykorzystując 200 ng RNA w 15  $\mu$ l wody DEPC.
4. Przygotowano iScript™ cDNA Synthesis Kit zgodnie z zaleceniami producenta przez przygotowanie mieszaniny 4  $\mu$ l iScript reaction mix oraz 1  $\mu$ l iScript reverse transcriptase.
5. Do opisanych próbek dodano po 5  $\mu$ l przygotowanej mieszaniny iScript oraz 15  $\mu$ l próbek.
6. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono przy użyciu CFX96 Touch Real-Time System (BioRad) z zastosowaniem poniższych parametrów inkubacji:

<b>Etap</b>	<b>Czas</b>	<b>Temperatura</b>
<b>1.</b>	5 minut	25°C
<b>2.</b>	30 minut	42°C
<b>3.</b>	5 minut	85°C
<b>4.</b>	Przechowywanie 4°C	

7. Stripy z cDNA przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania qRT-PCR.

### **2.14. Real-time PCR**

#### *Aparatura i wyposażenie:*

- Probówki (nr kat. TLS0801, Bio-Rad) z nakrywkami (nr kat. TCS0803, Bio-Rad)
- Automatyczne pipety miarowe
- Termocykler CFX96 Touch Real-Time System (Bio-Rad)

### Odczynniki i ich przygotowanie:

- Startery do real-time PCR (HPSF purified) (Syngen Biotech, Polska) sekwencja 5'-3':

Gen	Forward starter	Reverse starter
<i>MMP-2</i>	ACAGCAGGTCTCAGCCTCAT	TGAAGCCAAGCGGTCTAAGT
<i>MMP-9</i>	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	CCCTCAGTGAAGCGGTACAT
<i>GAPDH</i> *	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	GATGGTGATGGGTTTCCCGT
<i>β-aktyna</i>	CTCTTCCAGCCTTCCTTCT	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

\* GAPDH – dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa

- iTaq Universal SYBR® Green Supermix (nr kat. 172-5121, Bio-Rad)
- Woda DEPC-Treated (nr kat. AM9906, Ambion)

### Postępowanie

Analizę ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* w kardiomiocytach przeprowadzono wobec *GAPDH*, natomiast w płytkach krwi w stosunku do *β-aktyny*. PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, zgodnie z procedurą:

1. Rozmrożono, wymieszano oraz przechowywano na lodzie odczynniki: iTaq Universal SYBR® Green Supermix, primery oraz cDNA próbek, uzyskane na drodze odwrotnej transkrypcji.
2. W eppendorfie przygotowano odpowiednią ilość mieszaniny reakcyjnej. Proporcja na 1 reakcję:

Odczynnik	Objętość
iTaq Universal SYBR® Green Supermix	10 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	7 µl

3. Do opisanych próbek odpipetowano po 18  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej oraz 2  $\mu\text{l}$  cDNA próbki. Dla każdego oznaczanego genu przygotowano kontrolę negatywną, do których zamiast cDNA próbki dodano 2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC.

4. Real-time PCR przeprowadzono przy użyciu CFX96 Touch Real-Time System (BioRad) z zastosowaniem poniższych parametrów programu:

Etap	Czas	Temperatura
1.	3 minuty	95°C
2.	15 sekund	95°C
3.	45 sekund	95°C
4.	Odczyt płytki	
5.	Powtórzenie od punktu 2, 45 cykli	

5. Wyniki policzono z zastosowaniem wzoru  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ , gdzie:  $\Delta\Delta\text{CT}$  = średnia z cyklu dla genu badanego – średnia z cyklu dla genu referencyjnego.

## 2.15. ELISA MMP-2

*Sprzęt i wyposażenie:*

- Wielofunkcyjny czytnik płytek Spark (TECAN)

*Odczynniki i ich przygotowanie:*

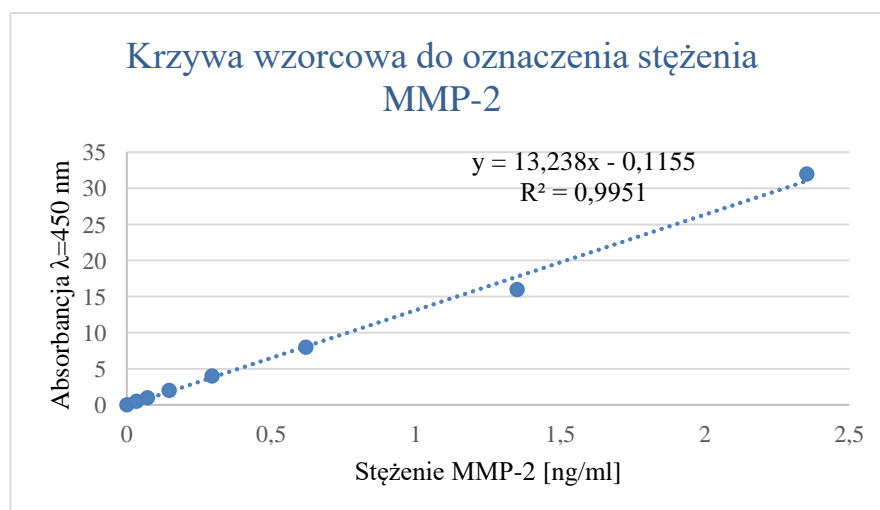
- Total MMP-2 Immunoassay (kat. MMP 200, R&D Systems, Minneapolis, USA)

*Postępowanie*

Stężenie całkowitej MMP-2 w homogenatach płytek krwi oznaczono metodą ELISA, zgodnie z instrukcją producenta:

1. Przygotowano rozcieńczenia standardu MMP-2 do uzyskania stężenia końcowego: 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml 0 ng/ml przy użyciu rozcieńzonego 5-krotnie Calibrator Diluentu.
2. Do dołków dodano po 50  $\mu\text{l}$  Assay Diluent oraz 50  $\mu\text{l}$  standardów lub próbek.
3. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając.
4. Płytkę płukano 4-krotnie przy użyciu Wash Buffer.

5. Do dołków dodano po 200  $\mu$ l Total MMP-2 Conjugate.
6. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając.
7. Płytkę płukano 4-krotnie przy użyciu Wash Buffer.
8. Do dołków dodano po 200  $\mu$ l Substrate Solution.
9. Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, chroniąc przed dostępem światła, bez wytrząsania.
10. Do dołków dodano po 50  $\mu$ l Stop Solution.
11. Zmierzono absorbancję przy długości fali 450 nm oraz 540 i 570 nm.
12. Absorbancję uzyskaną dla wszystkich dołków przy długości fali 450 nm skorygowano o absorbancję uzyskaną dla wszystkich dołków przy długości fali 570 nm i wartość absorbancji dla standardu MMP-2 o stężeniu 0 ng/ml.
13. Wykreślono krzywą wzorcową (wykres 2), stężenie MMP-2 w próbkach określono w oparciu o krzywą wzorcową.



**Wykres 2. Krzywa wzorcowa, równanie krzywej oraz współczynnik determinacji dla oznaczania stężenia MMP-2 metodą ELISA.**

## 2.16. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

*Sprzęt i wyposażenie:*

- Wielofunkcyjny czytnik płytek Spark (TECAN)

*Odczynniki i ich przygotowanie:*

- Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (nr kat. MAK066, Sigma-Aldrich)

### Postępowanie

Aktywność LDH została oznaczona w buforach zebranych po etapie niedokrwienia przy użyciu dostępnego komercyjnie testu, w którym zasada metody opiera się na redukcji NAD do NADH przez LDH. Aktywność LDH oznaczono metodą kolorymetryczną zgodnie z instrukcją producenta:

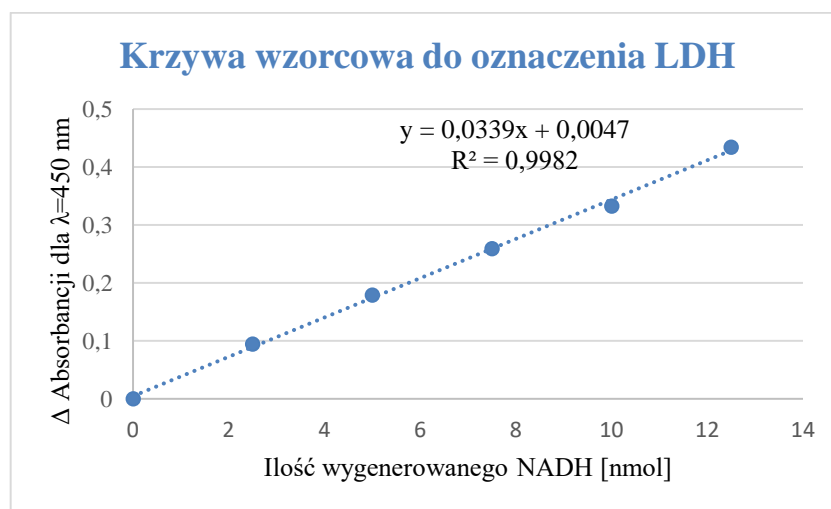
1. Przygotowano:

- a) standardy NADH dodając do dołek odpowiednio 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{l}$  1,25 mM standardu NADH. Dołki uzupełniono do 50  $\mu\text{l}$  przy użyciu załączonego przez producenta buforu LDH (Assay Buffer), otrzymując odpowiednio 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 oraz 12,5 nmol NADH w dołkach. Wszystkie standardy oznaczono w dubletach.
- b) próbki badane, które stanowiły bufor zebrane po etapie niedokrwienia. Użyto próbek nierozcieńczonych, w objętości 50  $\mu\text{l}$  na dołek. Każdą próbkę oznaczano dwukrotnie.
- c) mieszaninę reakcyjną (Master Reaction Mix), proporcja na 1 reakcję:

Odczynnik	Objętość
Bufor reakcyjny LDH (LDH Assay buffer)	48 $\mu\text{l}$
Mieszanina substratów LDH (LDH Substrate Mix)	2 $\mu\text{l}$

2. Do dołek zawierających 50  $\mu\text{l}$  standardu lub próbki badanej dodano 50  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej, zmieszano przy użyciu wielofunkcyjnego czytnika płytek Spark.
3. Po 3 minutach (czas początkowy ( $T_{\text{początkowy}}$ )) zmierzono absorbancję przy długości fali 450 nm. Zmierzoną absorbancję wykorzystano do obliczeń [ $(A_{450})_{\text{początkowa}}$ ].
4. Płytkę inkubowano w ciemności, w temperaturze 37°C, mierząc absorbancję przy długości fali 450 nm ( $A_{450}$ ) co 5 minut.
5. Pomiar wykonywano do momentu uzyskania wyżej wartości absorbancji w jednej z próbek badanych (o najwyższej aktywności LDH) niż wartość najwyższego standardu (12,5 nmol/dołek).
6. Przedostatni pomiar uznano za pomiar końcowy (czas końcowy ( $T_{\text{końcowy}}$ )), a absorbancję uzyskaną w tym pomiarze wykorzystano do obliczeń [ $(A_{450})_{\text{końcowa}}$ ].
7. Obliczenia niezbędne do uzyskania aktywności LDH w próbkach:

- a) od wartości absorbancji uzyskanych dla wszystkich standardów i próbek odjęto średnią wartość absorbancji dla 0 nmol standardu NADH;
- b) wykreślono krzywą wzorcową, którą przedstawiono poniżej (wykres 3):



**Wykres 3. Krzywa wzorcowa, równanie krzywej oraz współczynnik determinacji dla oznaczenia LDH.**

- c) obliczono zmianę w pomiarach od  $T_{\text{początkowego}}$  do  $T_{\text{końcowego}}$  dla wszystkich próbek, według wzoru:  $\Delta A_{450} = (A_{450})_{\text{końcowa}} - (A_{450})_{\text{początkowa}}$ , a następnie porównano do krzywej wzorcowej odczytując ilość powstałego NADH (B);
- d) Aktywność LDH [nmol/min/ml] wyliczono ze wzoru:

$$\text{Aktywność LDH} = \frac{B}{\text{czas reakcji} \cdot V} * \text{współczynnik rozcieńczenia próbki}, \text{ gdzie:}$$

B – ilość (nmol) NADH wygenerowanego w czasie reakcji

Czas reakcji =  $T_{\text{końcowy}} - T_{\text{początkowy}}$  (minuty)

V – objętość próbki (ml) dodana do dołka reakcyjnego.

## 2.17. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Normalność rozkładu sprawdzono przy użyciu testu Shapiro-Wilka dla  $n \geq 10$ , w pozostałych przypadkach do obliczeń zastosowano testy nieparametryczne. Do porównania zmian danego parametru w obrębie grupy badanej lub grupy kontrolnej zastosowano analizę wariancji dla prób zależnych – ANOVA Friedmana, w przypadku istotnych różnic zastosowano test post-hoc Dunna. Do zbadania wpływu czasu niedokrwienia na zmianę danego parametru w obrębie grupy badanej lub grupy kontrolnej wykorzystano regresję liniową. Do porównania zmiany ekspresji genów

dla MMP-2 i MMP-9 pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną wykorzystano test U-Manna-Whitneya. Do porównania zmiany pozostałych parametrów pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną wykorzystano test Wilcoxon dla prób zależnych lub test t dla prób niezależnych. W celu zbadania związku dwóch parametrów ze sobą, przeprowadzono analizę korelacji Pearsona lub Spearmana. Za istotną statystycznie uznano wartość  $p < 0,05$ . Wartości  $p = 0,05$  do  $p = 0,07$  uznano jako wartość bliską istotności statystycznej. Wyniki zaprezentowano jako średnia  $\pm$  błąd standardowy średniej.

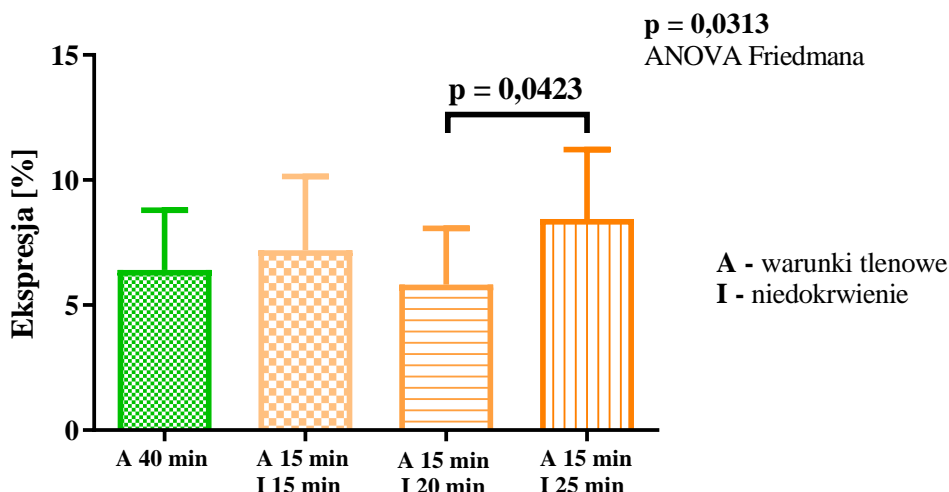
### III. WYNIKI

#### 1. Cytometryczna ocena aktywacji płytek krwi w grupie badanej

##### 1.1. Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia

Wyniki analizy cytometrycznej aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia zaprezentowano na wykresie 4. Wykazano wyższą ekspresję aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po 25 minutowym niedokrwieniu w porównaniu do płytek krwi po 20 minutowym niedokrwieniu ( $p = 0,0423$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na średnią ekspresję aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,2282$ ,  $p = 0,6829$ ).

#### Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia



Wykres 4. Ekspresja aktywowanej GP IIb/IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi, GP – glikoproteina.

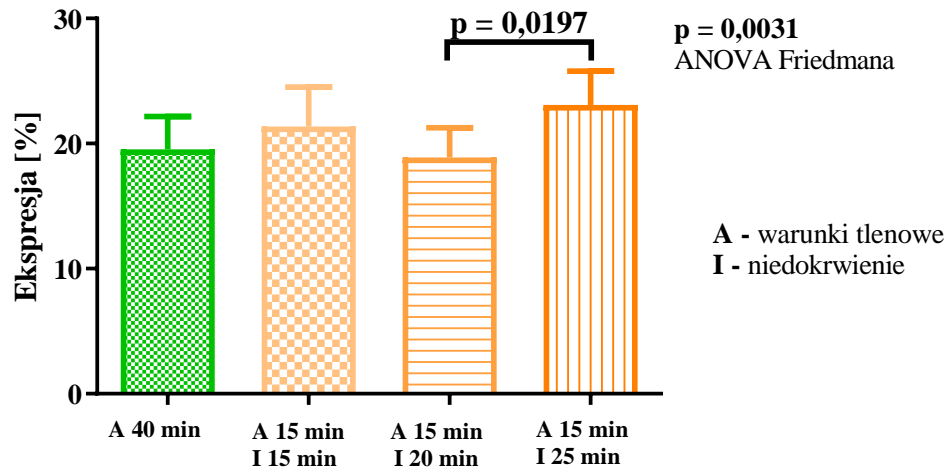
##### 1.2. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia

Wykres 5 przedstawia ekspresję powierzchniową P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek poddanych 25 minutowemu niedokrwieniu była wyższa niż na powierzchni płytek poddanych 20 minutowemu niedokrwieniu ( $p = 0,0197$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia



na średnią ekspresję P-selektyny na powierzchni płytek krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,1679$ ,  $p = 0,7312$ ).

### Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia



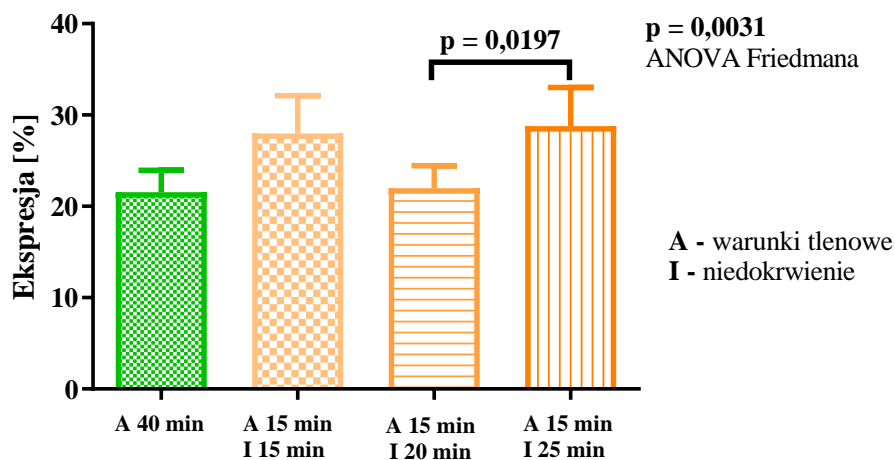
**Wykres 5. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc Dunna w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

### 1.3. Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia

Po etapie niedokrwienia zaobserwowano zmiany w ekspresji CD63 na powierzchni płytek krwi ( $p = 0,0031$ , wykres 6). Ekspresja białka CD63, na powierzchni płytek krwi, była wyższa po 25 minutowym niedokrwieniu niż po 20 minutowym niedokrwieniu ( $p = 0,0197$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na średnią ekspresję CD63 na powierzchni płytek krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,01079$ ,  $p = 0,9338$ ).

### Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia



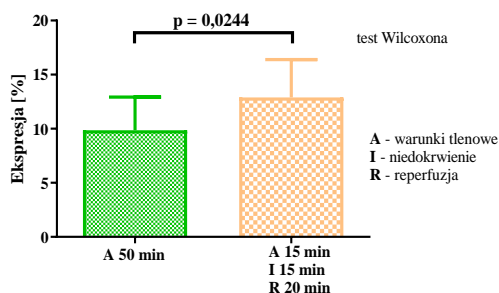
**Wykres 6. Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc Dunna w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

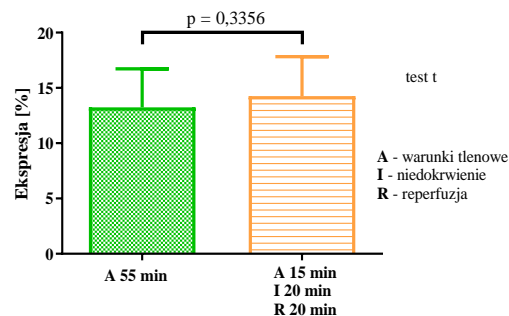
#### 1.4. Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji

Analiza cytometryczna powierzchniowych markerów aktywacji płytek krwi po etapie reperfuzji wykazała zwiększoną ekspresję aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi jedynie w warunkach I/R z 15 minutami niedokrwienia i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,0244$ , wykres 7 A) w porównaniu do warunków tlenowych. W warunkach I/R z 20 i 25 minutami niedokrwienia i 20 minutową reperfuzją nie wykazano zmian w ekspresji aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w porównaniu do warunków tlenowych (wykres 7 B–C).

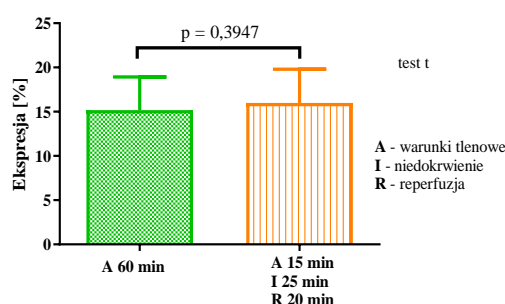
**A** Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 50'



**B** Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 55'



**C** Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w warunkach 25' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 60'

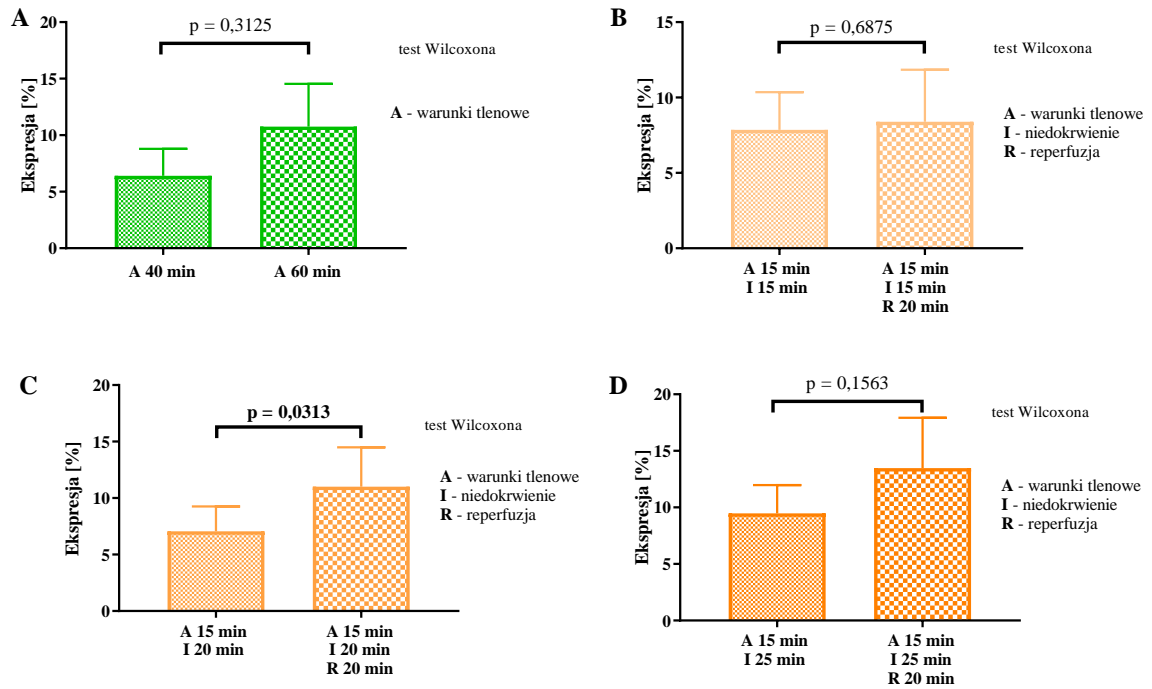


**Wykres 7. Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R w grupie badanej (HCM+PLT).**

(A) niedokrwienie 15 minut/reperfuzja 20 minut, (B) niedokrwienie 20 minut/reperfuzja 20 minut (C) niedokrwienie 25 minut/reperfuzja 20 minut. Zastosowane testy: test Wilcoxona (7 A) oraz test t dla prób zależnych (7 B-C), n = 11. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi, GP – glikoproteina.

Zmiany ekspresji aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 8. Wykazano wzrost ekspresji po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu niedokrwienia dla 20 minut niedokrwienia (p = 0,0313, wykres 8 C). Zaobserwowano wyższą ekspresję markera w warunkach tlenowych (60 minut) w porównaniu do ekspresji w warunkach tlenowych (40 minut), oraz po etapie reperfuzji w porównaniu do 15 i 25 minutowego niedokrwienia, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie. Co więcej, 20 minutowa reperfuzja prowadziła do normalizacji ekspresji markerów aktywacji płytek krwi, zwiększonej podczas 20 i 25 minutowego niedokrwienia.

## Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi



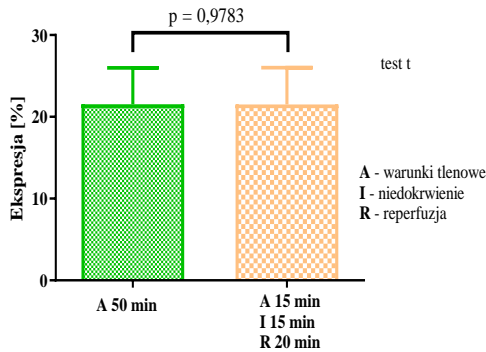
**Wykres 8. Zmiany ekspresji aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT). (A) w warunkach tlenowych ( $n = 5$ ), (B-D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji ( $n = 6$ ).**

Zastosowany test: test Wilcoxon. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. GP – glikoproteina, HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

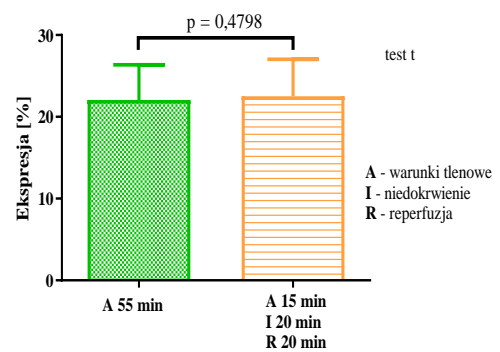
### 1.5. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji

Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji nie ulegała zmianie w warunkach I/R w porównaniu do warunków tlenowych, niezależnie od czasu trwania niedokrwienia (wykres 9).

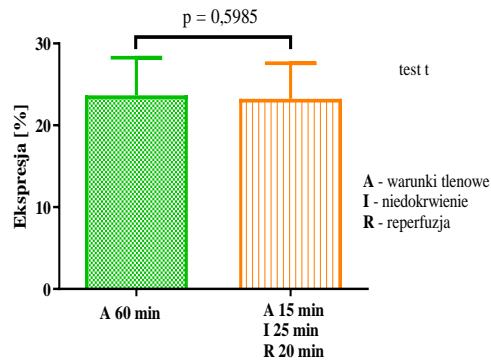
**A** Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 50'



**B** Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 55'



**C** Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi w warunkach 25' niedokrwienia i 20 minut reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 60'

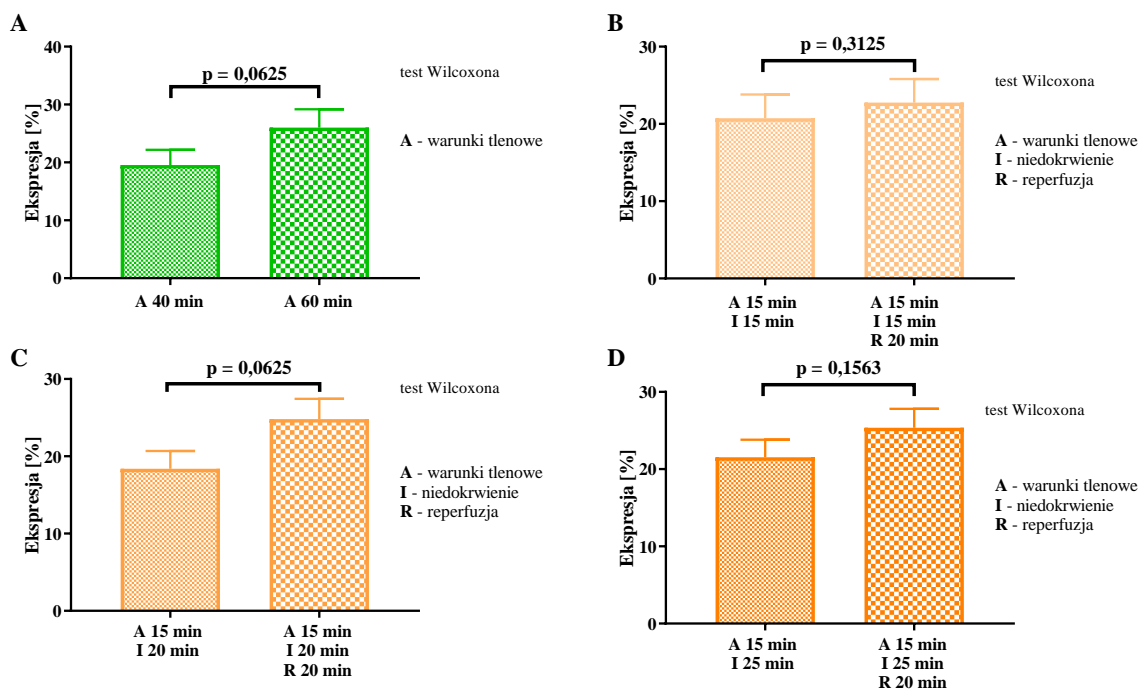


**Wykres 9. Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R w grupie badanej (HCM+PLT).**

(A) niedokrwienie 15 minut/reperfuzja 20 minut, (B) niedokrwienie 20 minut/reperfuzja 20 minut (C) niedokrwienie 25 minut/reperfuzja 20 minut. Zastosowany test: test t dla prób zależnych, n = 13. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

Zmiany ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 10. Nie zauważono istotnych zmian w ekspresji P-selektyny po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu niedokrwienia trwającego 15 i 20 minut (wykres 10 B, D). Wykazano tendencję do wyższej ekspresji P-selektyny po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu niedokrwienia po 20 minutach niedokrwienia ( $p = 0,0625$ , wykres 10 C). Dodatkowo wykazano silną tendencję ( $p = 0,0625$ , wykres 10 A) do wyższej ekspresji tego markera po 60 minutach w warunkach tlenowych w porównaniu do ekspresji uzyskanej po 40 minutach w warunkach tlenowych.

## Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi



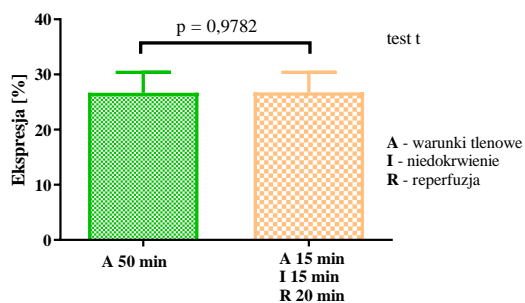
**Wykres 10. Zmiany ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT). (A) w warunkach tlenowych, (B-D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji.**

Zastosowany test: test Wilcoxon, n = 5. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomyocyty, PLT – płytki krwi.

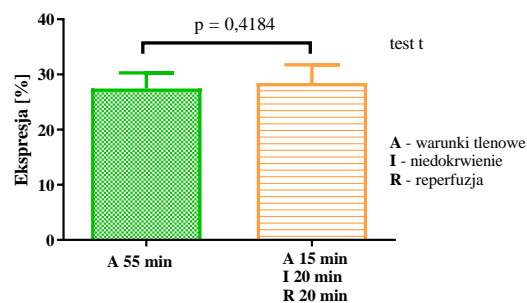
### 1.6. Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji

Ekspresja cząsteczki CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie reperfuzji nie ulegała zmianie w warunkach I/R w porównaniu do warunków tlenowych, niezależnie od czasu trwania niedokrwienia (wykres 11).

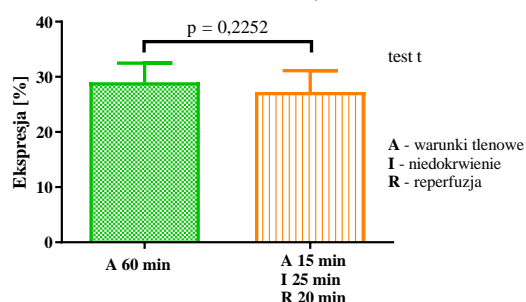
**A** Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 50'



**B** Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 55'



**C** Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi w warunkach 25' niedokrwienia i 20' reperfuzji oraz w warunkach tlenowych 60'

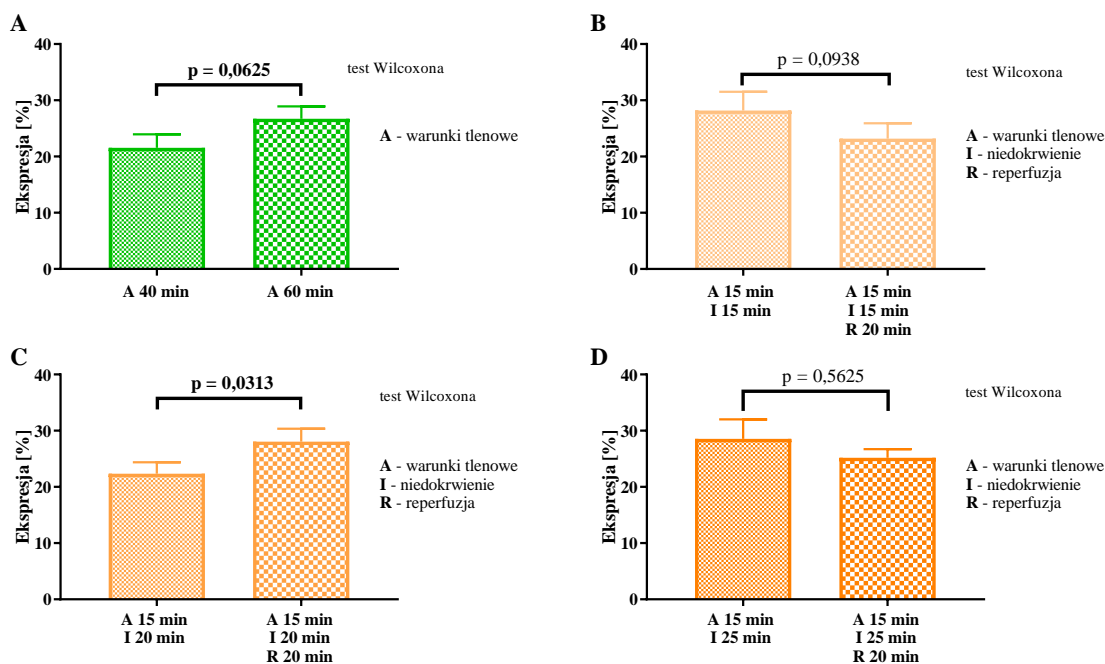


**Wykres 11. Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R w grupie badanej (HCM+PLT).**

(A) niedokrwienie 15 minut/reperfuzja 20 minut, (B) niedokrwienie 20 minut/reperfuzja 20 minut (C) niedokrwienie 25 minut/reperfuzja 20 minut. Zastosowany test: test t dla prób zależnych, n = 12. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

Zmiany ekspresji CD63 na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 12. Wykazano wyższą ekspresję CD63 po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu 20 minutowego niedokrwienia ( $p = 0,0313$ ) (wykres 12 C). Dodatkowo wykazano tendencję do wyższej ekspresji CD63 na powierzchni płytek krwi utrzymywanych w warunkach tlenowych przez 60 minut w porównaniu do ekspresji CD63 na powierzchni płytek krwi utrzymywanych w warunkach tlenowych przez 40 minut ( $p = 0,0625$ , wykres 12 A). Płytki krwi wykazywały tendencję do niższej ekspresji CD63 na swojej powierzchni po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu 15 minutowego niedokrwienia ( $p = 0,0938$ , wykres 12 B).

### Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi



**Wykres 12. Zmiany ekspresji CD63 na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT). (A) w warunkach tlenowych, (B-D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji.**

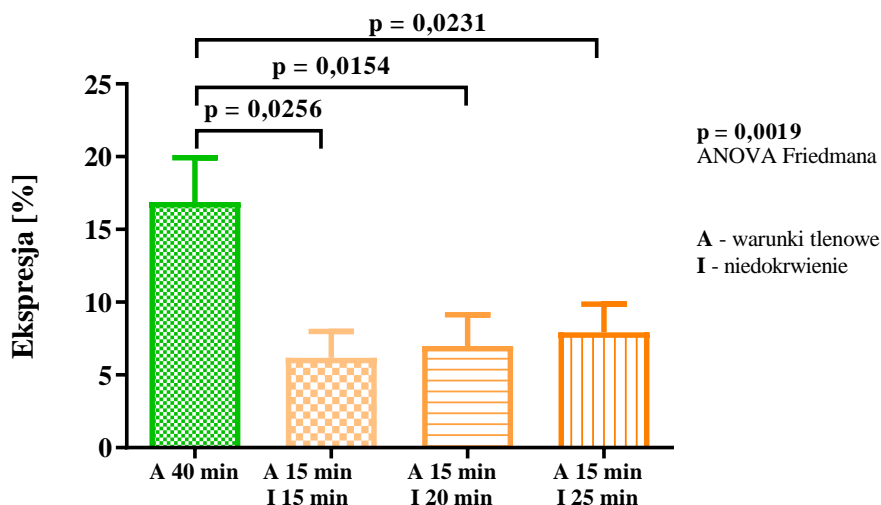
Zastosowany test: test Wilcoxona, n = 5. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 1.7. Badanie cytometryczne PMP

Bufory po etapie niedokrwienia (rycina 4 i 7) w grupie badanej poddano badaniu cytometrycznemu. MP wykazujące ekspresję, charakterystycznego dla płytek krwi, antygenu CD61 uznano za PMP. Jak pokazano na wykresie 13, ekspresja CD61 na powierzchni PMP w warunkach tlenowych była wyższa niż w warunkach niedokrwienia, niezależnie od czasu jego trwania ( $p = 0,0019$ ). Dodatkowo zauważyć można, że ekspresja CD61 na powierzchni PMP po 20 i 25 minutowym niedokrwieniu była wyższa średnio o 13,34% i 28,31% w porównaniu do ekspresji po niedokrwieniu trwającym 15 minut. Wpływ czasu niedokrwienia na wzrost średniej ekspresji CD61 na powierzchni PMP potwierdzono w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,9989$ ,  $p = 0,0210$ ), co przedstawiono na wykresie 14.

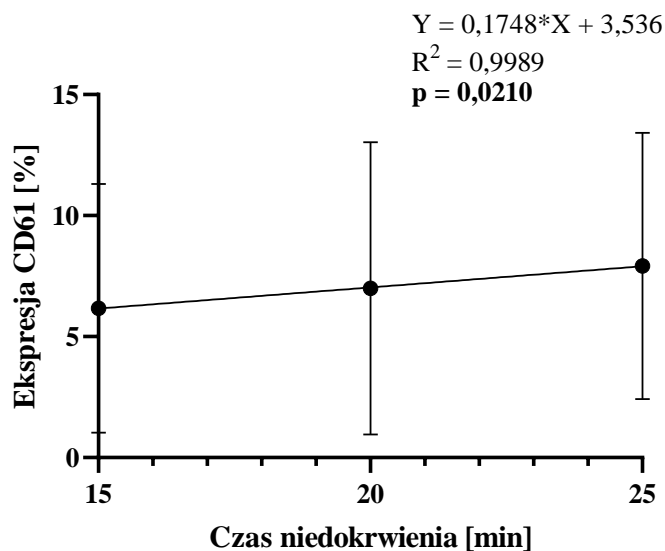


### Ekspresja CD61 na powierzchni mikrocząstek pochodzenia płytkowego (PMP)



**Wykres 13. Ekspresja antygeny CD61 na powierzchni PMP w buforach po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi, PMP – mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego.



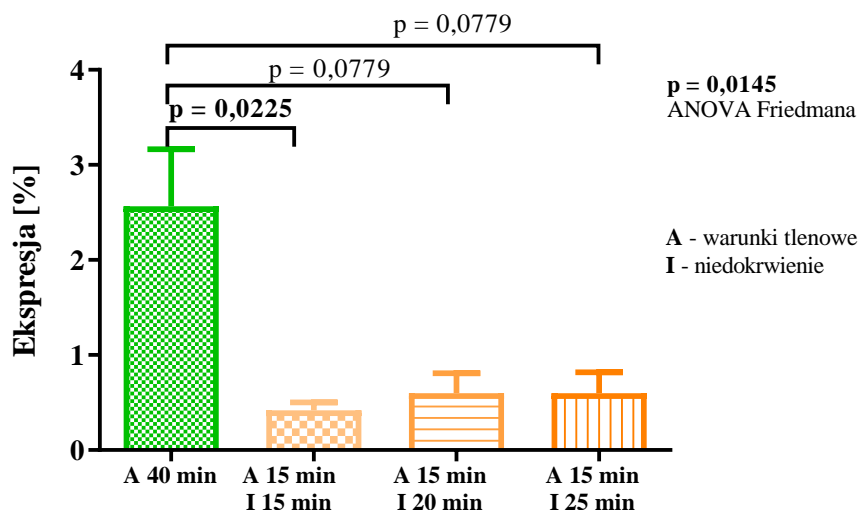
**Wykres 14. Wpływ czasu niedokrwienia na średnią ekspresję CD61 na powierzchni PMP w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: test regresji liniowej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

Ekspresja powierzchniowa aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni PMP była niższa po 15 minutach niedokrwienia niż w warunkach tlenowych, co przedstawiono na wykresie 15 (p = 0,0225). Dodatkowo po 20 (p = 0,0779) i 25 (p = 0,0779) minutowym

niedokrwieniu PMP wykazywały silną tendencję do niższej ekspresji tej GP na swojej powierzchni. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na ekspresję aktywowanej GP IIB-IIIa na powierzchni PMP w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,7500$ ,  $p = 0,3333$ ).

### Ekspresja aktywowanej GP IIB-IIIa na powierzchni mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego (PMP)



**Wykres 15. Ekspresja aktywowanej GP IIB-IIIa na powierzchni PMP w buforach po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).**

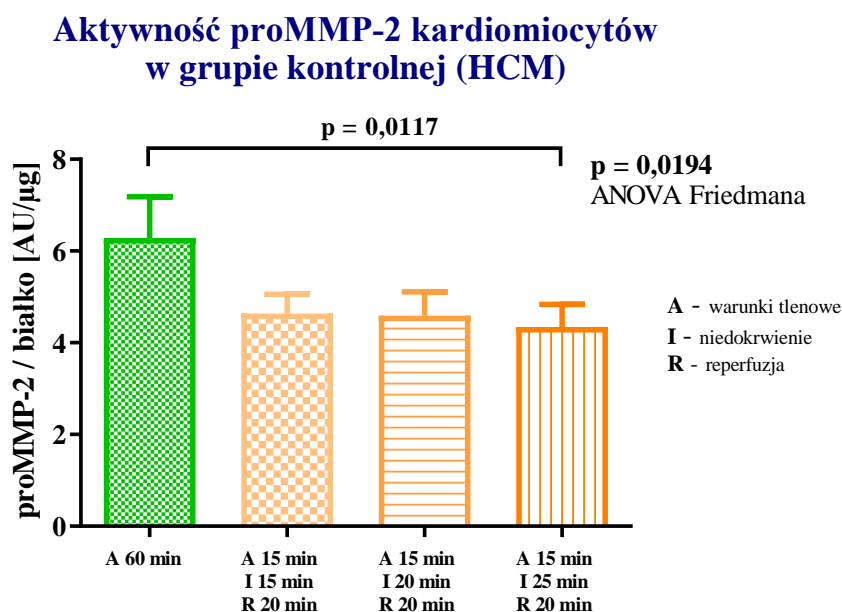
Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. GP – glikoproteina, HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

## 2. Aktywność metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w homogenatach komórkowych

### 2.1. Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach niepoddanych interakcji z płytkami krwi

Badanie homogenatów kardiomiocytów (grupa kontrolna, HCM, ryc. 5), wykazało obniżoną aktywność formy proMMP-2 w kardiomiocytach w warunkach 25 minutowego niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji w porównaniu do kardiomiocytów inkubowanych w warunkach tlenowych ( $p = 0,0117$ ), co przedstawiono na wykresie 16. Po 15 minutach niedokrwienia i 20 minutach reperfuzji oraz po 20 minutach niedokrwienia i 20 minutach reperfuzji aktywność proMMP-2 także uległa obniżeniu o średnio 26,13%, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie. Nie wykazano wpływu

czasu niedokrwienia na aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,8778$ ,  $p = 0,2273$ ).



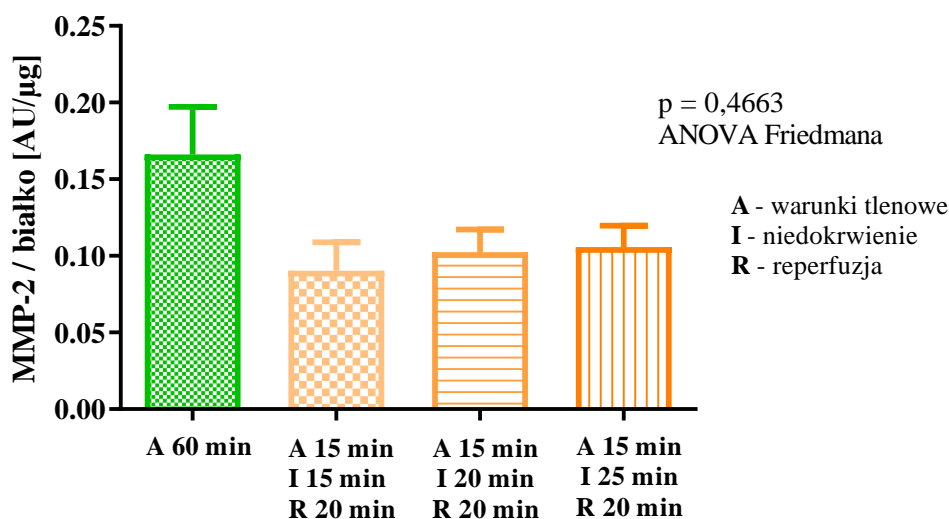
**Wykres 16. Zmiany aktywności proMMP-2 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

## 2.2. Aktywność MMP-2 w kardiomiocytach niepoddanych interakcji z płytkami krwi

Aktywność MMP-2 oznaczona metodą zymografii żelatynowej w homogenatach kardiomiocytów (grupa kontrolna, HCM) po niedokrwieniu i reperfuzji nie wykazała zmian w wyniku I/R w teście ANOVA w porównaniu do kardiomiocytów inkubowanych w warunkach tlenowych ( $p = 0,4663$ ), co przedstawiono na wykresie 17. Jednak odnotowano obniżenie aktywności MMP-2 w kardiomiocytach utrzymywanych w warunkach I/R, średnio o 36,36% do 45,65%, w porównaniu do kardiomiocytów utrzymywanych w warunkach tlenowych. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na aktywność MMP-2 w kardiomiocytach w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,9016$ ,  $p = 0,2031$ ).

### Aktywność MMP-2 kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM)



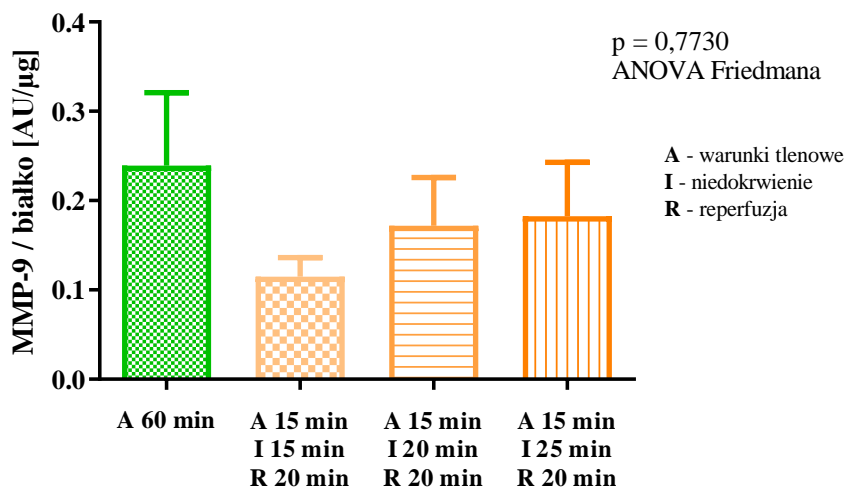
**Wykres 17. Zmiany aktywności MMP-2 w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

### 2.3. Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach niepoddanych interakcji z płytkami krwi

Badanie aktywności MMP-9 w homogenatach kardiomiocytów (grupa kontrolna, HCM) nie wykazało zmian w aktywności MMP-9 pomiędzy grupą poddaną warunkom tlenowym a grupami poddanymi warunkom I/R ( $p = 0,7730$ ), co przedstawiono na wykresie 18. Chociaż nie wykazano liniowego wzrostu aktywności MMP-9 wraz z czasem trwania niedokrwienia w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,8643$ ,  $p = 0,2402$ ) to średnia aktywność MMP-9 była wyższa w warunkach 20 minut niedokrwienia i 20 minut reperfuzji oraz 25 minut niedokrwienia i 20 minut reperfuzji w porównaniu do warunków 15 minut niedokrwienia i 15 minut reperfuzji o odpowiednio 49,56% i 58,78%.

### Aktywność MMP-9 kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM)



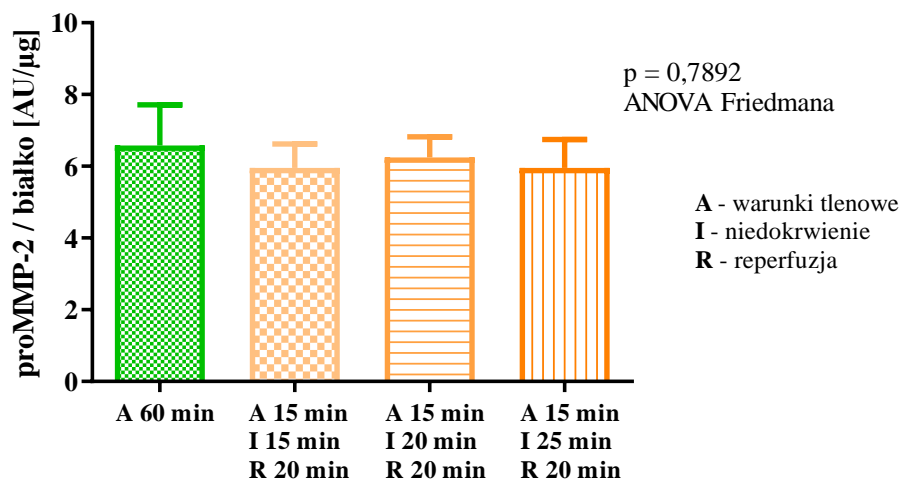
**Wykres 18. Zmiany aktywności MMP-9 w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

#### 2.4. Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi

Analiza zymogramów (grupa badana, HCM+PLT) nie wykazała zmian w aktywności formy proMMP-2 ( $p = 0,7892$ ) w kardiomiocytach poddanych warunkom I/R w porównaniu do kardiomiocytów w warunkach tlenowych, co przedstawiono na wykresie 19. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na średnią aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 3,494e-005$ ,  $p = 0,9962$ ).

### Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT)



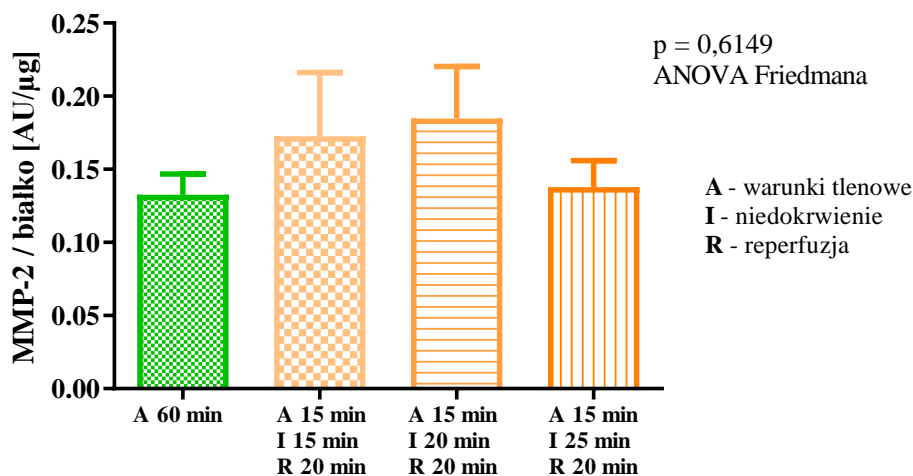
**Wykres 19. Zmiany proMMP-2 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 2.5. Aktywność MMP-2 w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi

Nie wykazano zmian aktywności MMP-2 ( $p = 0,6149$ ), oznaczonej metodą zymografii żelatynowej, w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT), co zaprezentowano na wykresie 20. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na średnią aktywność MMP-2 w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,5153$ ,  $p = 0,4903$ ).

### Aktywność MMP-2 kardiomiocytów w grupie badanej (HCM+PLT)



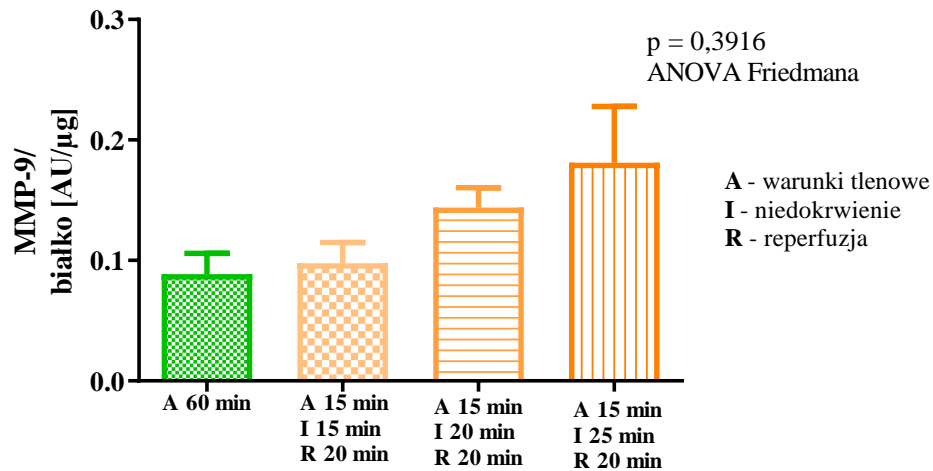
**Wykres 20. Zmiany aktywności MMP-2 w homogenatach kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 2.6. Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach poddanych interakcji z płytkami krwi

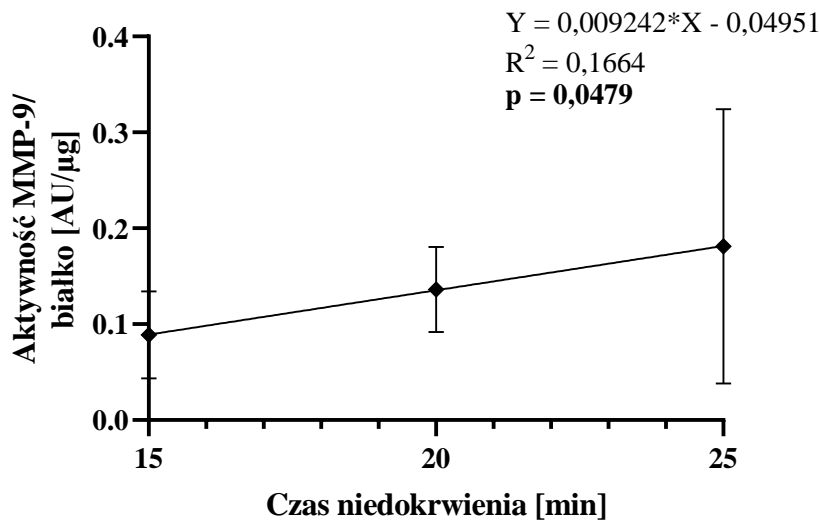
Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 21. Nie wykazano zwiększonej aktywności MMP-9 w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi w porównaniu do kontroli tlenowej ( $p = 0,3916$ ). Jednak jak widać na wykresie 21, pomimo braku istotności statystycznej uzyskanych wyników, średnia aktywność MMP-9 w kardiomiocytach poddanych warunkom I/R była wyższa o 11,07% – 126,70% niż w warunkach tlenowych. W teście regresji liniowej wykazano zwiększenie średniej aktywności MMP-9 w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi wraz z czasem trwania niedokrwienia ( $R^2 = 0,1664$ ,  $p = 0,0479$ , wykres 22).

### Aktywność MMP-9 kardiomiocytów w grupie badanej (HCM+PLT)



Wykres 21. Zmiany aktywności MMP-9 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (HCM+PLT).

Zastosowany test: ANOVA Friedmana, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.



Wykres 22. Wpływ czasu niedokrwienia na aktywność MMP-9 w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT).

Zastosowany test: test regresji liniowej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

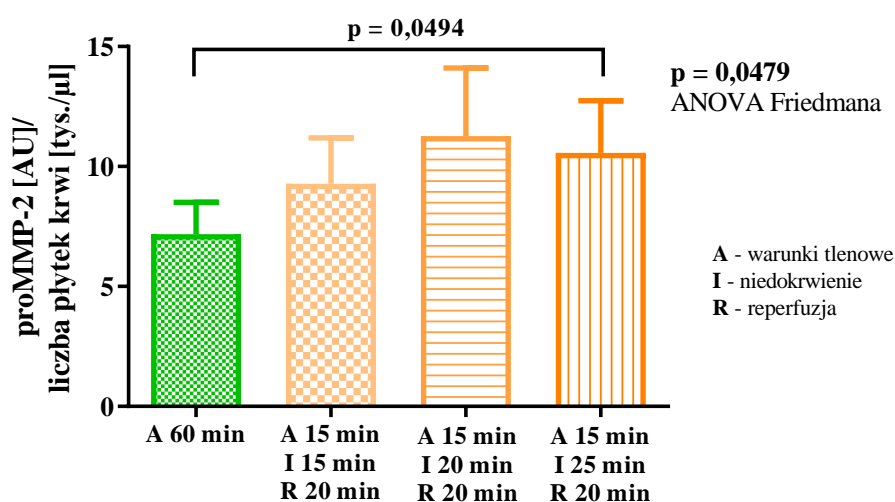
#### 2.7. Aktywność proMMP-2 w płytkach krwi po I/R

Analiza zymogramów płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT) wykazała, że obecność formy pro-MMP-2 ulegała zmianie w wyniku I/R ( $p = 0,0479$ ). Jak pokazano na wykresie 23, proMMP-2, oznaczona ilościowo metodą zymografii żelatynowej, była wyższa w płytkach krwi po I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową



reperfuzją w porównaniu do płytek krwi inkubowanych w warunkach tlenowych ( $p = 0,0494$ ). Po 15 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji oraz 20 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji wartość proMMP-2 była wyższa, średnio o odpowiednio 29,21% oraz 56,85%, w porównaniu do wartości uzyskanych w warunkach tlenowych, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na średnią aktywność proMMP-2 w płytkach krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,4075$ ,  $p = 0,5592$ ).

### Aktywność proMMP-2 w płytkach krwi po I/R w grupie badanej (HCM+PLT)



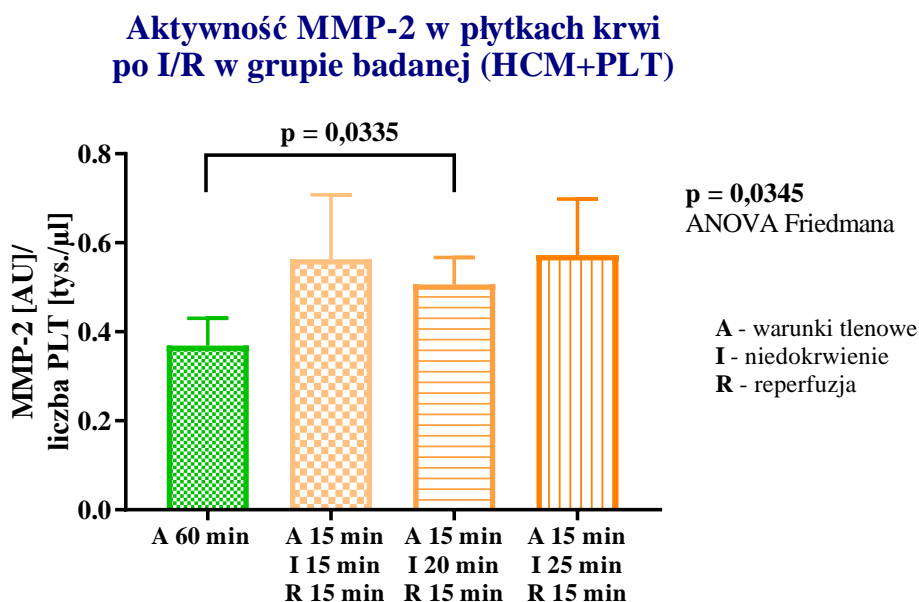
**Wykres 23. Zmiany proMMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 11$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, I/R – niedokrwienie/reperfuzja, PLT – płytki krwi.

### 2.8. Aktywność MMP-2 w płytkach krwi po I/R

Zmiany aktywności MMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT) uzyskane metodą zymografii żelatynowej przedstawiono na wykresie 24 ( $p = 0,0345$ ). Aktywność MMP-2 była wyższa w płytkach krwi po I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją w porównaniu do płytek krwi inkubowanych w warunkach tlenowych ( $p = 0,0335$ ). W warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją oraz 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją aktywność MMP-2 w płytkach krwi także była wyższa w porównaniu do warunków tlenowych średnio o 52,49% i 55,07%, jednak prawdopodobnie ze względu na duży rozrzut uzyskanych wyników, nie była to zmiana

istotna statystycznie. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na aktywność MMP-2 w płytkach krwi ( $R^2 = 0,0001225$ ,  $p = 0,9537$ ).

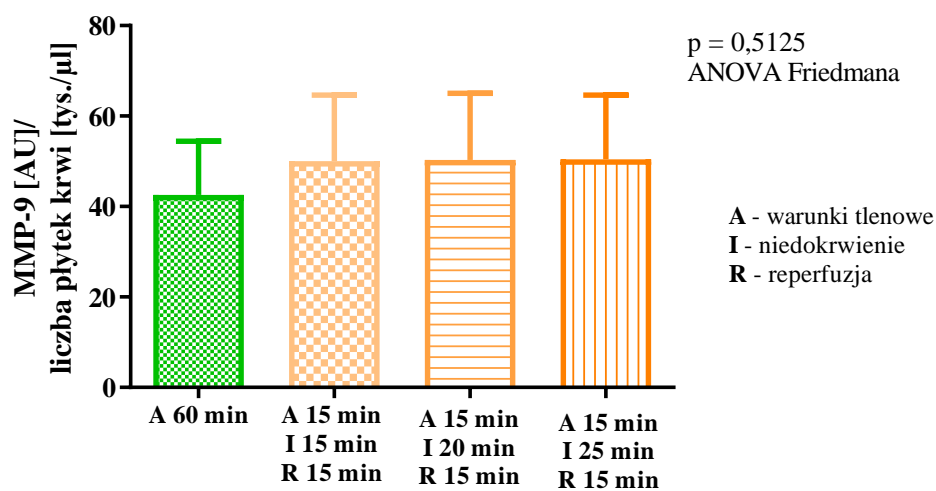


**Wykres 24. Zmiany aktywności MMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT).** Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 10$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, I/R – niedokrwienie/reperfuzja, PLT – płytki krwi.

## 2.9. Aktywność MMP-9 w płytkach krwi po I/R

Wyniki aktywności MMP-9 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT) uzyskane metodą zymografii żelatynowej przedstawiono na wykresie 25. Aktywność MMP-9 w I/R była wyższa średnio o 17,61% – 18,59% w porównaniu do wartości uzyskanych w warunkach tlenowych, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie ( $p = 0,5125$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na średnią aktywność MMP-9 w płytkach krwi w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,9643$ ,  $p = 0,1210$ ).

### Aktywność MMP-9 w płytkach krwi po I/R w grupie badanej (HCM+PLT)



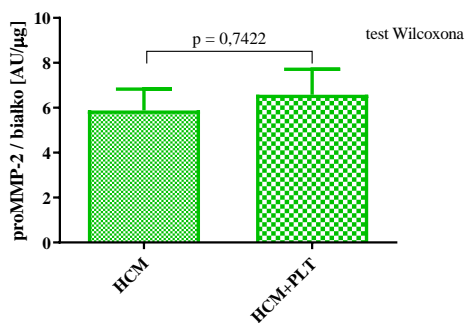
**Wykres 25. Zmiany MMP-9 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana, n = 12. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, I/R – niedokrwienie/reperfuzja, PLT – płytki krwi,.

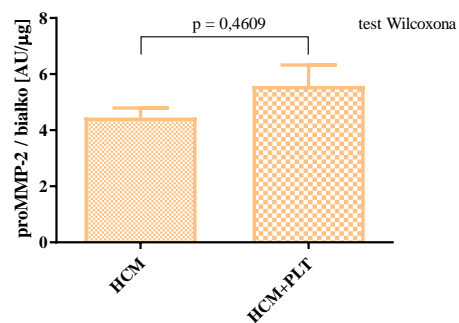
## 2.10. Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 kardiomiocytów

Porównanie proMMP-2 pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną przedstawiono na wykresie 26. Obecność płytek krwi nie wpływała na zmiany proMMP-2 kardiomiocytów w warunkach tlenowych (wykres 26 A,  $p = 0,7422$ ) oraz w warunkach I/R, z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją (wykres 26 B,  $p = 0,4609$ ). W warunkach 20 minutowego niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji (wykres 26 C,  $p = 0,0547$ ) oraz 25 minutowego niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji (wykres 26 D,  $p = 0,0547$ ) w obecności płytek krwi zaobserwowano bardzo silną tendencję do wyższej aktywności proMMP-2 kardiomiocytów w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, jak widać na wykresach 26 B–26 D, w warunkach I/R, niezależnie od czasu trwania niedokrwienia, aktywność proMMP-2 w grupie badanej była wyższa niż w grupie kontrolnej średnio o od 24,55% do 48,28%.

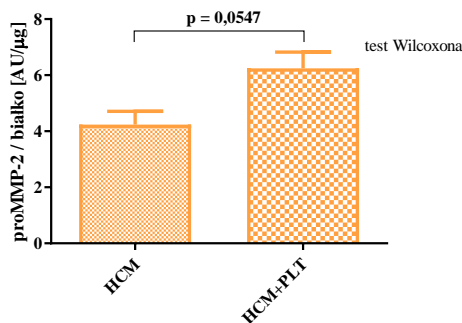
A Wpływ płytek krwi na proMMP-2 kardiomiocytów w warunkach tlenowych 60'



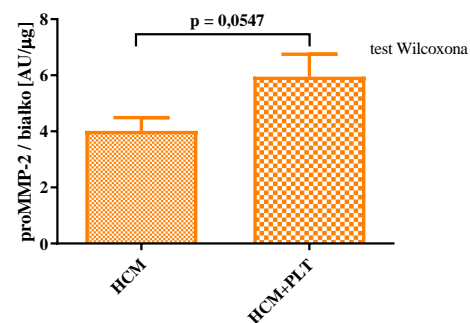
B Wpływ płytek krwi na proMMP-2 kardiomiocytów w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji



C Wpływ płytek krwi na proMMP-2 kardiomiocytów w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji



D Wpływ płytek krwi na proMMP-2 kardiomiocytów w warunkach 25' niedokrwienia i 20' reperfuzji

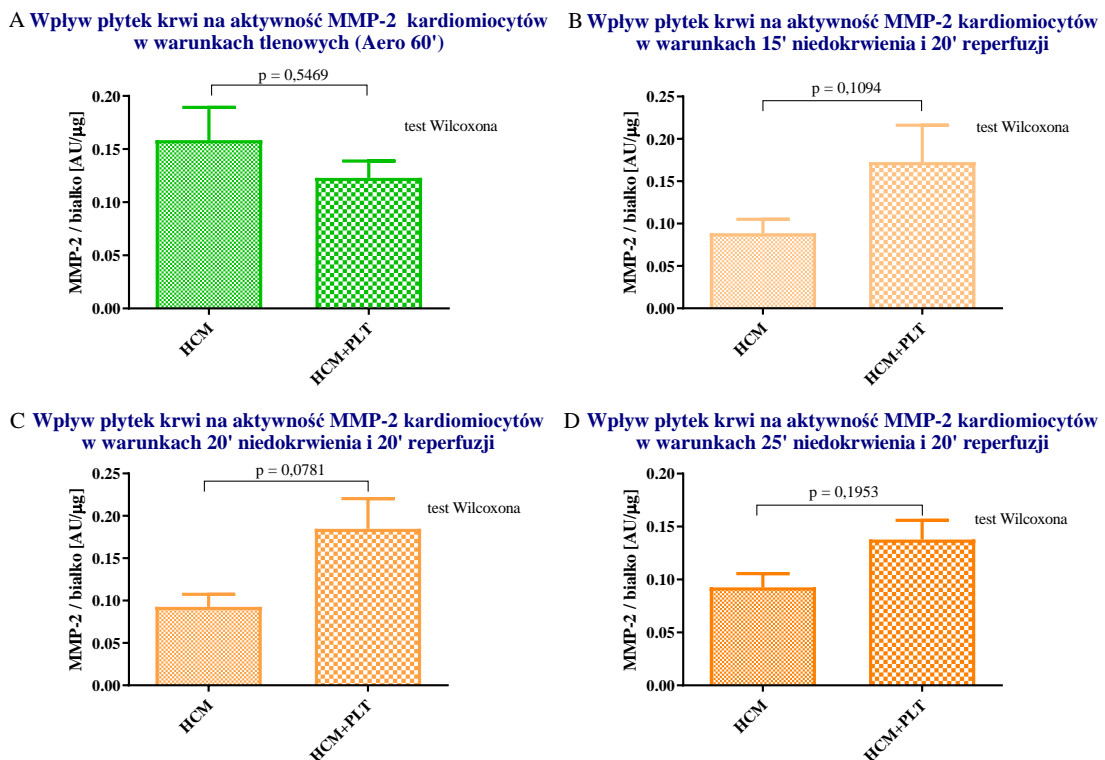


### Wykres 26. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany proMMP-2 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów.

Porównanie proMMP-2 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxon,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

## 2.11. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-2 w kardiomiocytach

Porównanie aktywności MMP-2 pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną przedstawiono na wykresie 27. Obecność płytek krwi nie wpływała na zmiany w aktywności MMP-2 kardiomiocytów w warunkach tlenowych (wykres 27 A,  $p = 0,5469$ ) oraz w warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem (wykres 27 B,  $p = 0,1094$ ) oraz 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją (wykres 27 D,  $p = 0,1953$ ). W warunkach I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją (wykres 27 C,  $p = 0,0781$ ), w obecności płytek krwi, wykazano bardzo silną tendencję do wyższej aktywności MMP-2 w kardiomiocytach w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, jak przedstawiono na wykresach 27 B–27 D, w warunkach I/R, niezależnie od czasu trwania niedokrwienia, aktywność MMP-2 w grupie badanej była wyższa niż w grupie kontrolnej średnio o od 48,80% do 99,18%.

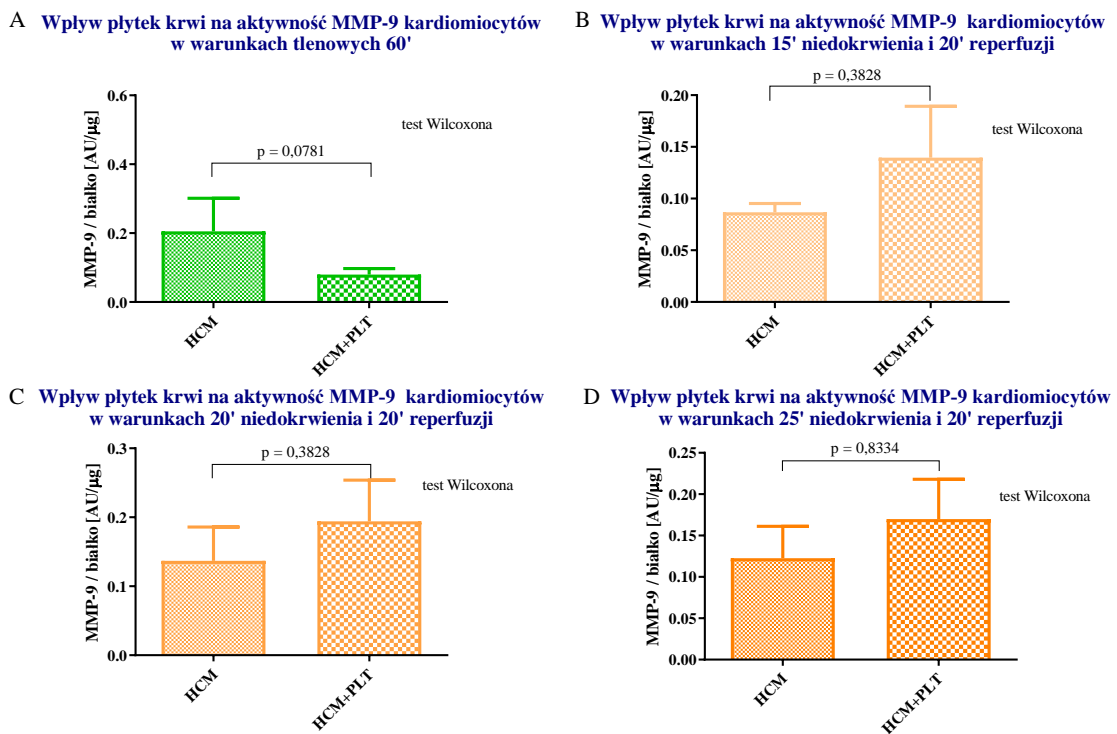


**Wykres 27. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-2 w homogenatach kardiomiocytów.**

Porównanie aktywności MMP-2 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxona,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

## 2.12. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 kardiomiocytów

Porównanie aktywności MMP-9 pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną przedstawiono na wykresie 28. Pomimo że w warunkach tlenowych zauważono tendencję do obniżonej aktywności MMP-9 kardiomiocytów w obecności płytek krwi ( $p = 0,0781$ , wykres 28 A), w warunkach I/R nie odnotowano istotnego wpływu płytek na aktywność MMP-9 niezależnie od czasu trwania niedokrwienia (wykres 28 B–D). Jednak, jak zobrazowano na wykresie 28 B–D, w warunkach I/R, niezależnie od czasu trwania niedokrwienia, aktywność MMP-9 w grupie badanej była średnio od 38,78% do 60,87% wyższa niż w grupie kontrolnej (wykres 28 B–28 D).



**Wykres 28. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-9 w homogenatach kardiomiocytów.**

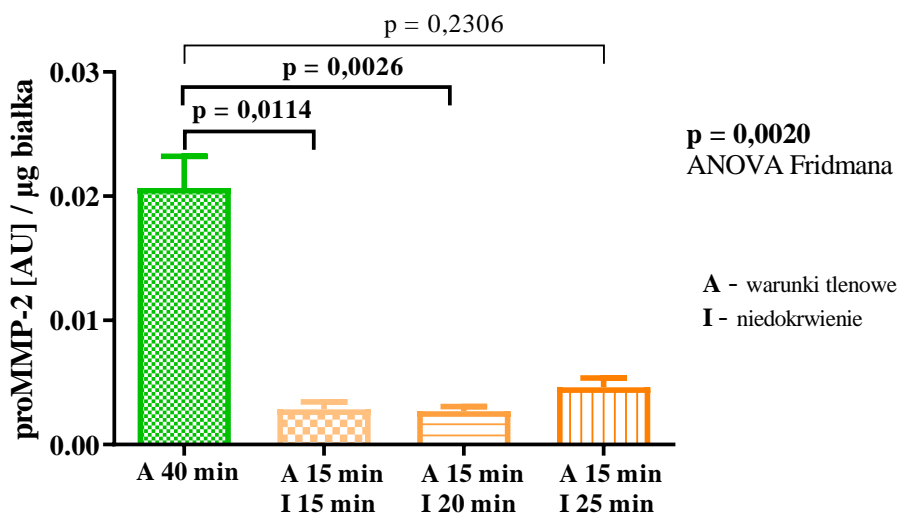
Porównanie aktywności MMP-9 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxona,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

### 3. Uwalnianie i aktywność MMP w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia

#### 3.1. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej

Celem oceny aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w przestrzeni pozakomórkowej kardiomiocytów, oznaczono aktywność proMMP-2 w buforach zebranych po niedokrwieniu kardiomiocytów, nieskontaktowanych z płytkami krwi (HCM). Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej była znacząco niższa po 15 minutowym ( $p = 0,0114$ ) i 20 minutowym ( $p = 0,0026$ ) niedokrwieniu kardiomiocytów w porównaniu do aktywności proMMP-2 oznaczonej w warunkach tlenowych, co przedstawiono na wykresie 29. W warunkach 25 minutowego niedokrwienia aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej wykazała ponad 4-krotne obniżenie w porównaniu do warunków tlenowych, jednak nie stwierdzono istotności statystycznej uzyskanych wyników. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,6830$ ,  $p = 0,3807$ ).

#### Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (HCM)



Wykres 29. Zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (HCM).

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 7$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

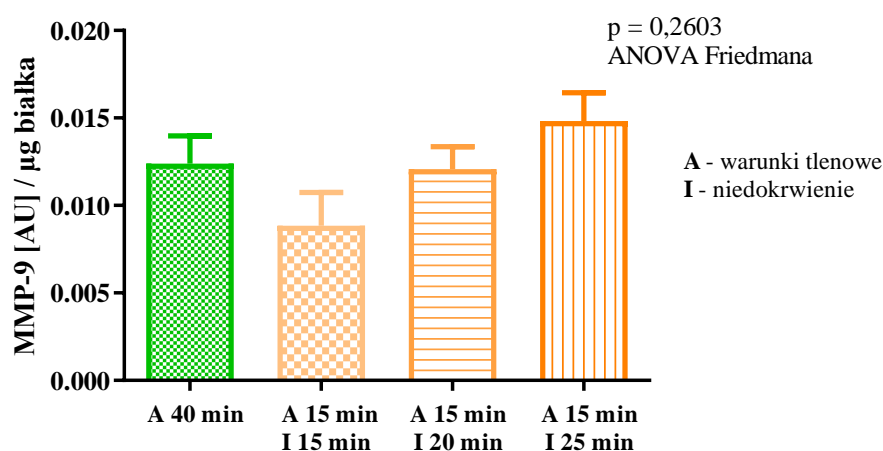
### 3.2. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej

Nie wykryto aktywnej formy MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej metodą zymografii żelatynowej.

### 3.3. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej

Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej oznaczono w buforach zebranych po niedokrwieniu kardiomiocytów nieskontaktowanych z płytkami krwi (HCM). Nie zaobserwowano zmian aktywności MMP-9 w buforach po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej w porównaniu do kardiomiocytów w warunkach tlenowych ( $p = 0,2603$ , wykres 30). Jednakże w teście regresji liniowej wykazano zwiększenie średniej aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej wraz z czasem trwania niedokrwienia ( $R^2 = 0,9977$ ,  $p = 0,0302$ , wykres 31).

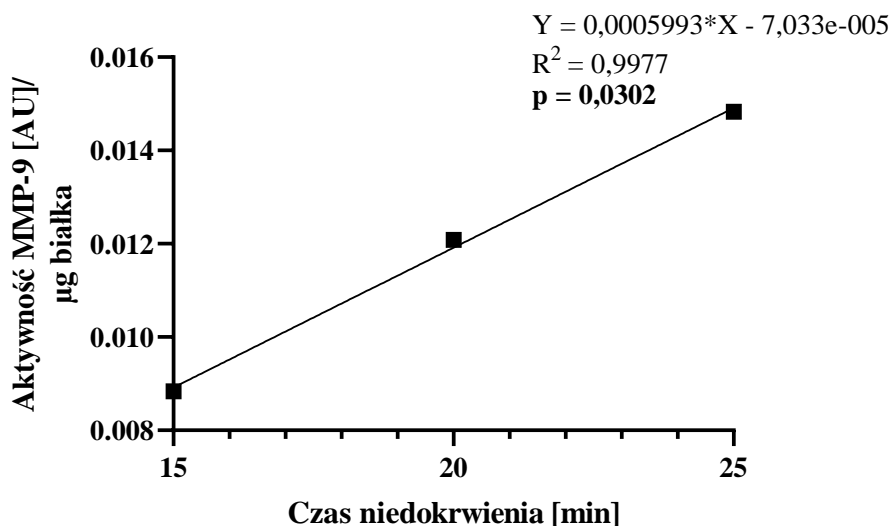
#### Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po niedokrwieniu w grupie kontrolnej (HCM)



Wykres 30. Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (HCM).

Zastosowany test: ANOVA Friedmana,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.



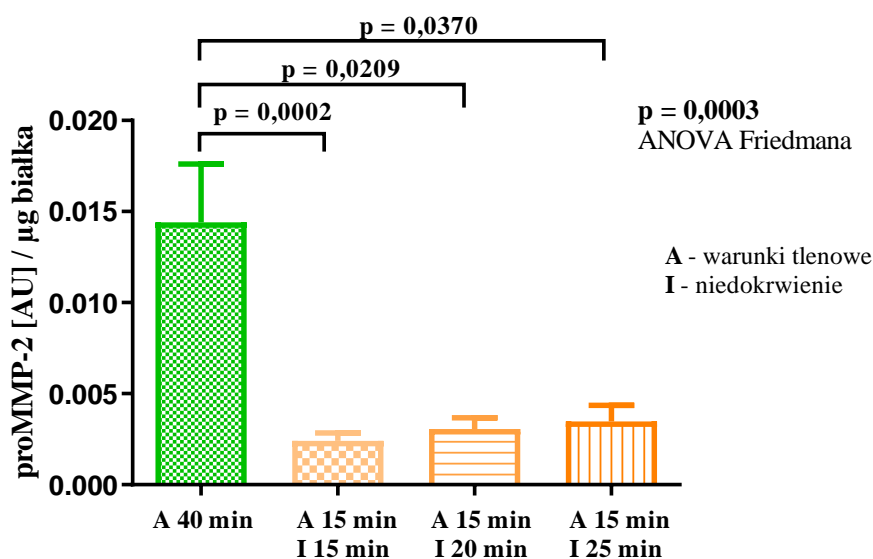


**Wykres 31. Wpływ czasu niedokrwienia na średnią aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej (HCM).**  
Zastosowany test: test regresji liniowej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

### 3.4. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej

Wyniki aktywności proMMP-2 oznaczonej w buforach po niedokrwieniu w grupie badanej zaprezentowano na wykresie 32. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej (HCM+PLT) była niższa po niedokrwieniu kardiomiocytów, niezależnie od czasu trwania niedokrwienia, w porównaniu do aktywności proMMP-2 oznaczonej w warunkach tlenowych ( $p = 0,0003$ ). W teście regresji liniowej wykazano tendencję do wzrostu aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia wraz z czasem trwania niedokrwienia ( $R^2 = 0,9857$ ,  $p = 0,0763$ ).

### Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po niedokrwieniu w grupie badanej (HCM+PLT)



**Wykres 32. Zmiany aktywności proMMP-2 w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami, n = 9. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

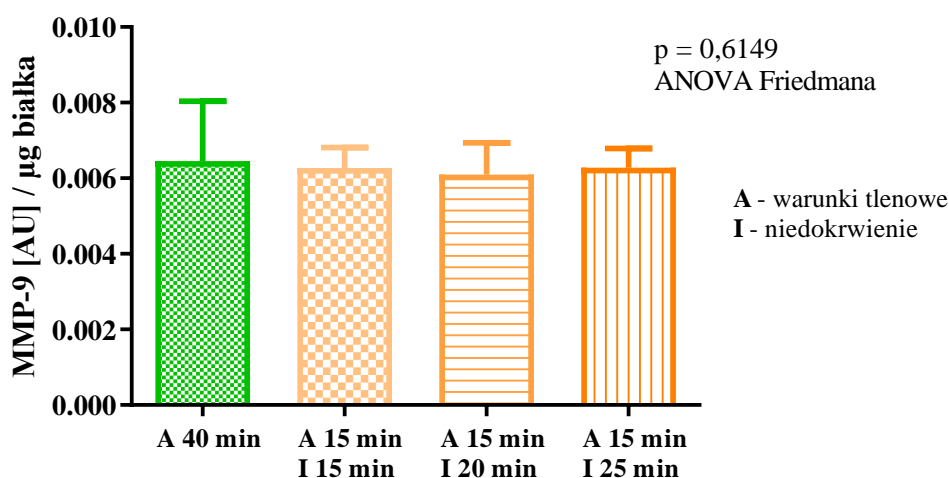
#### 3.5. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej

Nie wykryto aktywnej formy MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej metodą zymografii żelatynowej.

#### 3.6. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej

Analiza zymogramów nie wykazała zmian aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (HCM+PLT) ( $p = 0,6149$ ), co przedstawiono na wykresie 33. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej po etapie niedokrwienia w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,001165$ ,  $p = 0,9783$ ).

### Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po niedokrwieniu w grupie badanej (HCM+PLT)



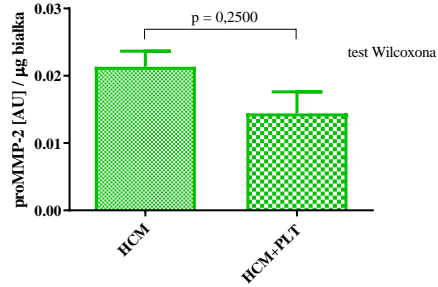
Wykres 33. Zmiany aktywności MMP-9 oznaczonej w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).

Zastosowany test: ANOVA Friedmana,  $n = 7$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

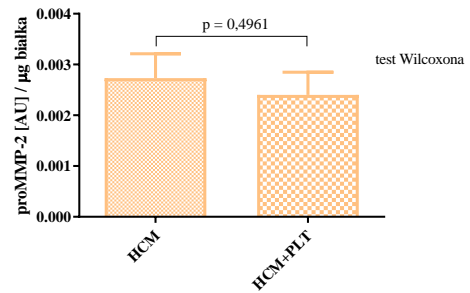
### 3.7. Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia

Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 oznaczoną metodą zymografii żelatynowej w przestrzeni pozakomórkowej po niedokrwieniu przedstawiono na wykresie 34. Porównanie aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kardiomiocytów nieskontaktowanych z płytkami krwi (HCM) z grupą kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (HCM+PLT) nie wykazało wpływu obecności płytek krwi na aktywność proMMP-2 zarówno w warunkach tlenowych, jak i w warunkach niedokrwienia, niezależnie od czasu jego trwania.

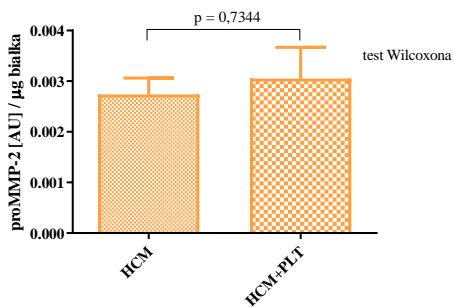
A Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach tlenowych 40'



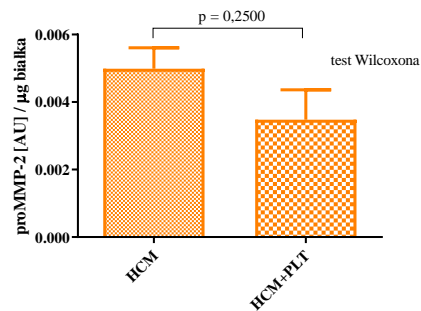
B Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po 15' niedokrwienia



C Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po 20' niedokrwienia



D Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po 25' niedokrwienia

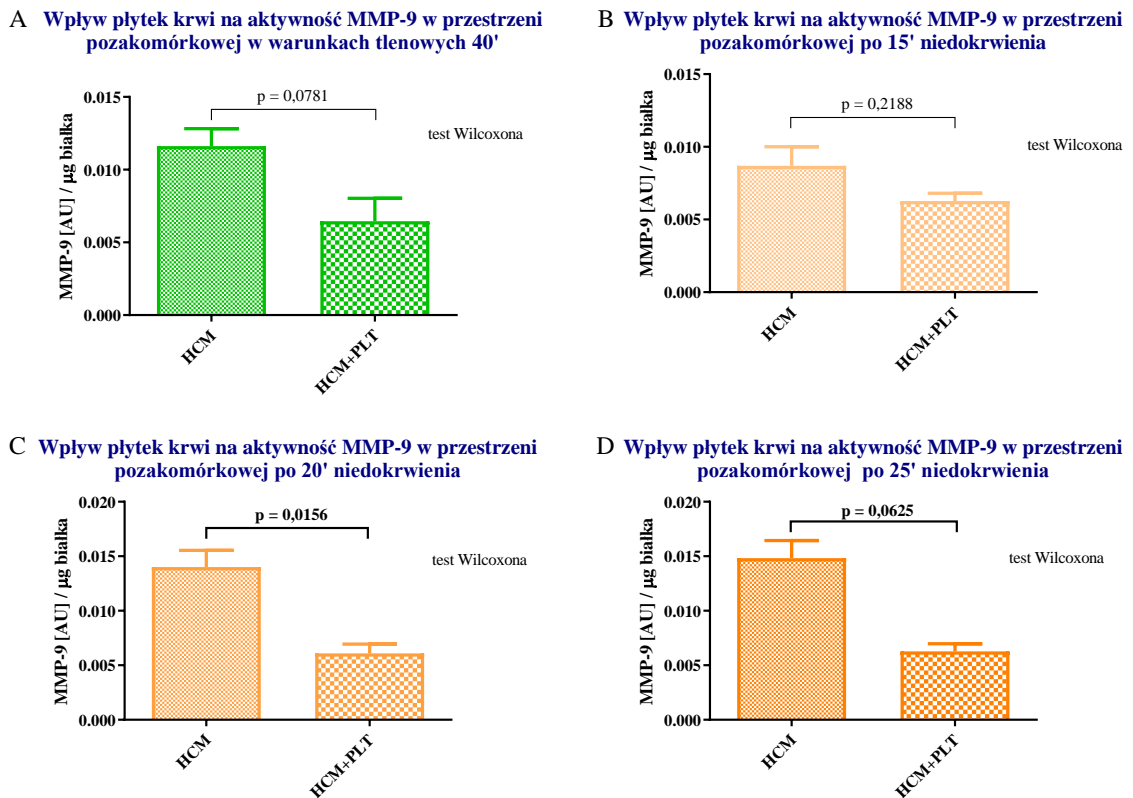


**Wykres 34. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności proMMP-2 oznaczonej w buforach zebranych w warunkach tlenowych i po etapie niedokrwienia.**

Porównanie aktywności MMP-2 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 40 min, (B) niedokrwienie 15 min, (C) niedokrwienie 20 min, (D) niedokrwienie 25 min. Zastosowany test: test Wilcoxon, n = 9. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej.

### 3.8. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia

Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia przedstawiono na wykresie 35. Zaobserwowano niższą aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej (HCM+PLT) w porównaniu do grupy kontrolnej (HCM) po 20 minutowym niedokrwieniu (wykres 35 C) ( $p = 0,0156$ ). Dodatkowo w warunkach tlenowych ( $p = 0,0781$ ) oraz po 25 minutowym niedokrwieniu ( $p=0,0625$ ) zaobserwowano silną tendencję do niższej aktywności MMP-9 w obecności płytek krwi (wykres 35 A, D). Po 15 minutach niedokrwienia (wykres 35 B) nie wykazano istotnych zmian w aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej ( $p = 0,2188$ ), pomimo obserwowanego trendu.



**Wykres 35. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-9 oznaczonej w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach tlenowych i po etapie niedokrwienia.**

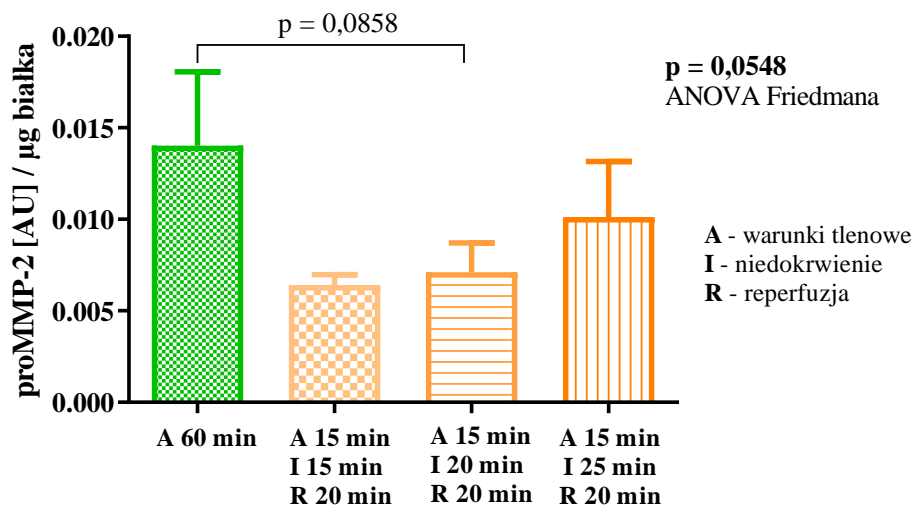
Porównanie aktywności MMP-9 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 40 min ( $n = 7$ ), (B) niedokrwienie 15 min ( $n = 7$ ), (C) niedokrwienie 20 min ( $n = 7$ ), (D) niedokrwienie 25 min ( $n = 5$ ). Zastosowany test: test Wilcoxona. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej.

#### 4. Uwalnianie i aktywność MMP w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji

##### 4.1. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej

Jak przedstawiono na wykresie 36, zaobserwowano tendencję bliską istotności statystycznej do niższej aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej kardiomiocytów poddanych I/R w porównaniu do kardiomiocytów inkubowanych w warunkach tlenowych w grupie kontrolnej ( $p = 0,0548$ ). Analiza czasu niedokrwienia nie wykazała wpływu czasu niedokrwienia na zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej ( $R^2 = 0,8854$ ,  $p = 0,2198$ ).

##### Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM)



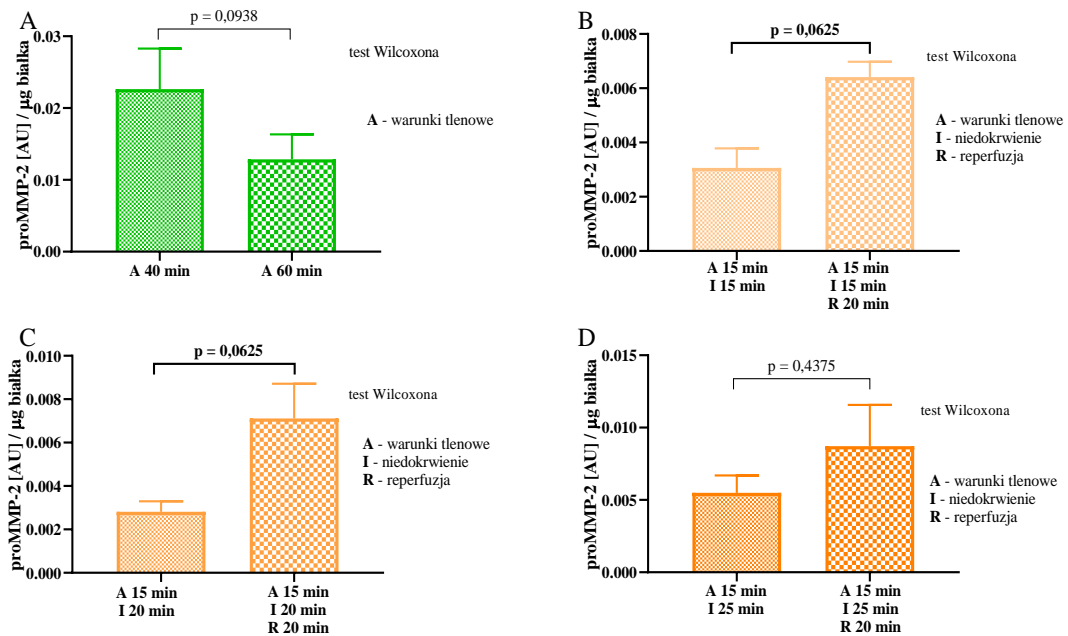
**Wykres 36. Zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

Wykazano tendencję bliską istotności statystycznej do wyższej aktywności proMMP-2 po etapie reperfuzji przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej (HCM) w porównaniu do etapu niedokrwienia dla 15 i 20 minut niedokrwienia ( $p = 0,0625$ , wykres 37 B–C). Zaobserwowano wyższą aktywność proMMP-2 po etapie reperfuzji w porównaniu do 25 minutowego niedokrwienia, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie (wykres 37 D). Co ciekawe, wykazano tendencję do niższej aktywności

proMMP-2 w warunkach tlenowych 60 minut w porównaniu do warunków tlenowych 40 minut (wykres 37 A).

### Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej



**Wykres 37. Zmiany aktywności proMMP-2 w grupie kontrolnej (HCM). (A) w warunkach tlenowych (n = 6), (B–D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji (n = 5).** Zastosowany test: test Wilcoxona. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

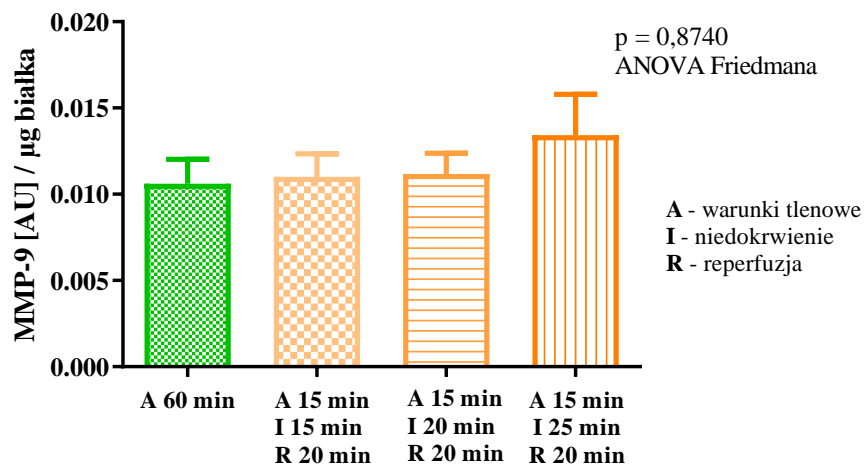
#### 4.2. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej

Nie wykryto aktywnej formy MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej metodą zymografii żelatynowej.

#### 4.3. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej

Wyniki aktywności MMP-9 oznaczonej w buforach po etapie reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM) przedstawiono na wykresie 38. Nie wykazano zmian w aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po I/R w porównaniu do warunków tlenowych (p = 0,8740). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,8024$ , p = 0,2932).

### Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM)



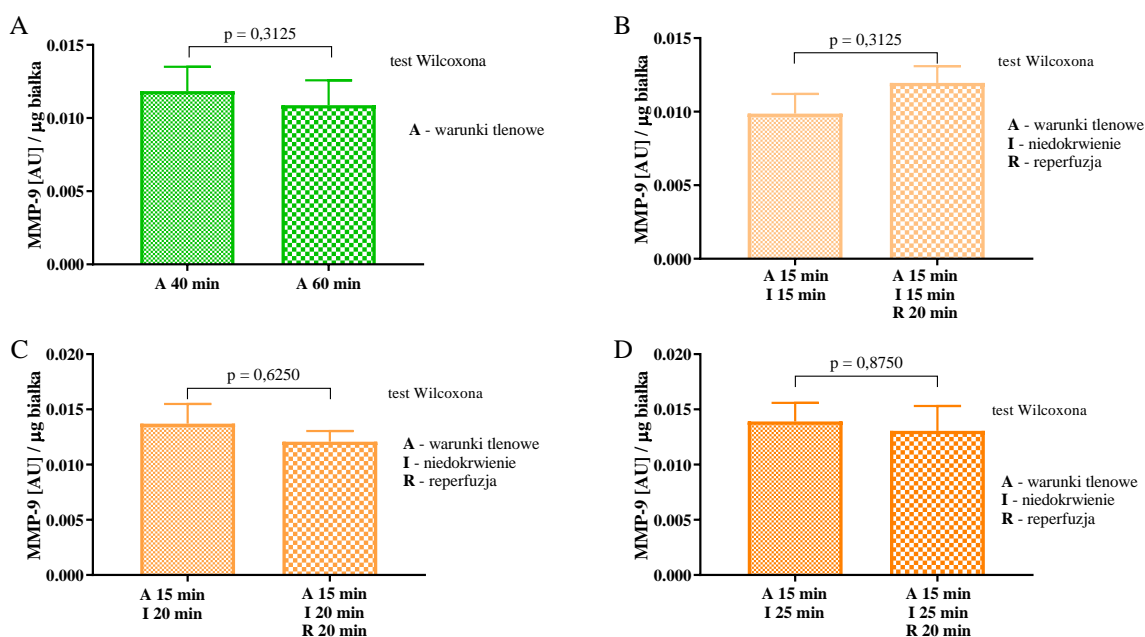
**Wykres 38. Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana, n = 6. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

Nie wykazano zmian w aktywności MMP-9 zarówno w warunkach tlenowych 60 i 40 minut, jak i po etapie reperfuzji w porównaniu do aktywności MMP-9 po etapie niedokrwienia (wykres 39).



### Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej



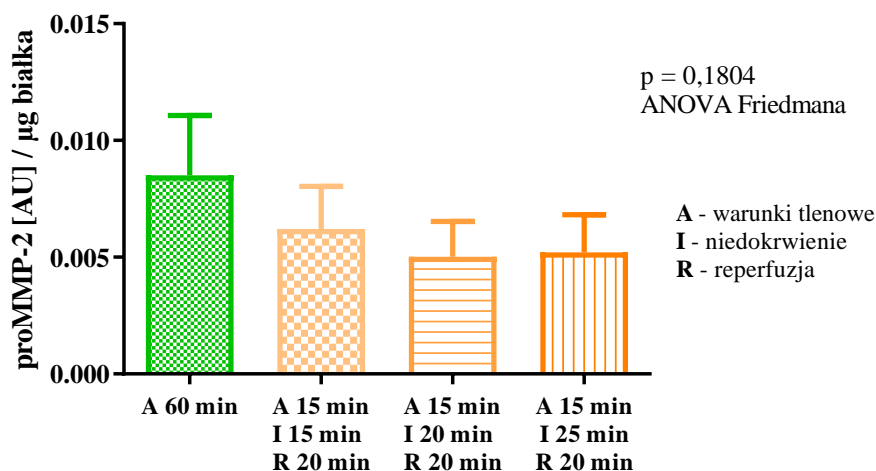
**Wykres 39. Zmiany aktywności MMP-9 w grupie kontrolnej (HCM). (A) w warunkach tlenowych, (B–D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji.**

Zastosowany test: test Wilcoxon,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

#### 4.4. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej

Wyniki aktywności proMMP-2 oznaczonej w buforach zebranych po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 40. Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej nie wykazała zmian w wyniku I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,1804$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,6140$ ,  $p = 0,4268$ ).

### Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT)

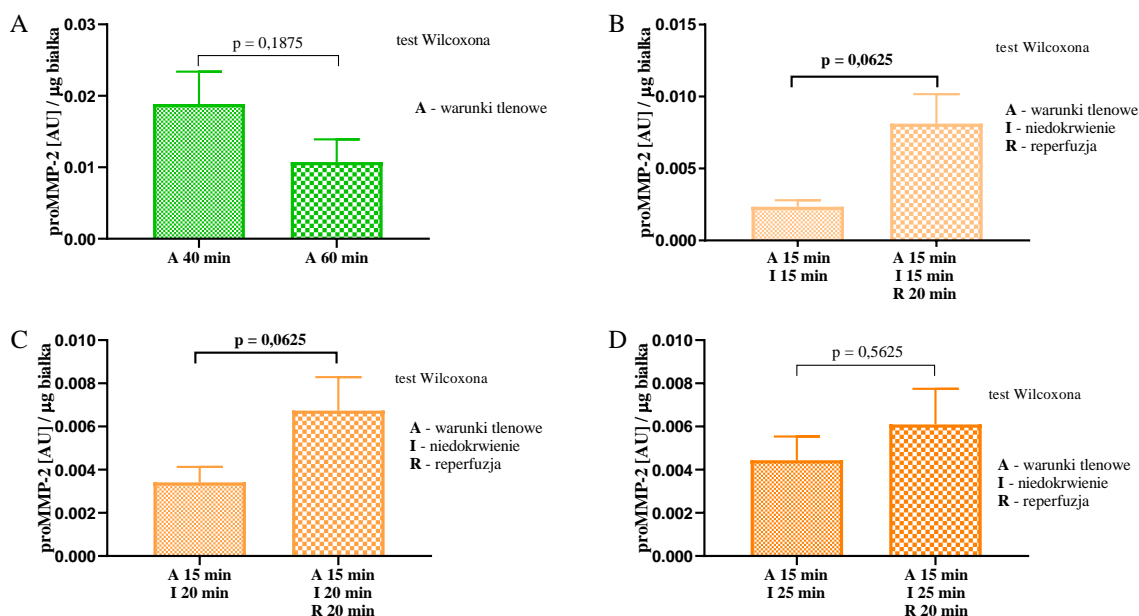


**Wykres 40. Zmiany aktywności proMMP-2 w buforach zebranych po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana,  $n = 7$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

Wykazano bardzo silną tendencję do wzrostu aktywności proMMP-2 po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu niedokrwienia dla 15 i 20 minut niedokrwienia ( $p = 0,0625$ , wykres 41 B–C). Zaobserwowano wyższą aktywność proMMP-2 po etapie reperfuzji w porównaniu do 25 minutowego niedokrwienia, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie (wykres 41 D). Dodatkowo aktywność proMMP-2 w warunkach tlenowych 60 minut była niższa niż w warunkach tlenowych 40 minut, jednak nie była to zmiana istotna statystycznie (wykres 41 A).

## Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej



**Wykres 41. Zmiany aktywności proMMP-2 w grupie badanej (HCM+PLT): (A) w warunkach tlenowych (n = 5), (B–D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji (n = 6).**

Zastosowany test: test Wilcoxona. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

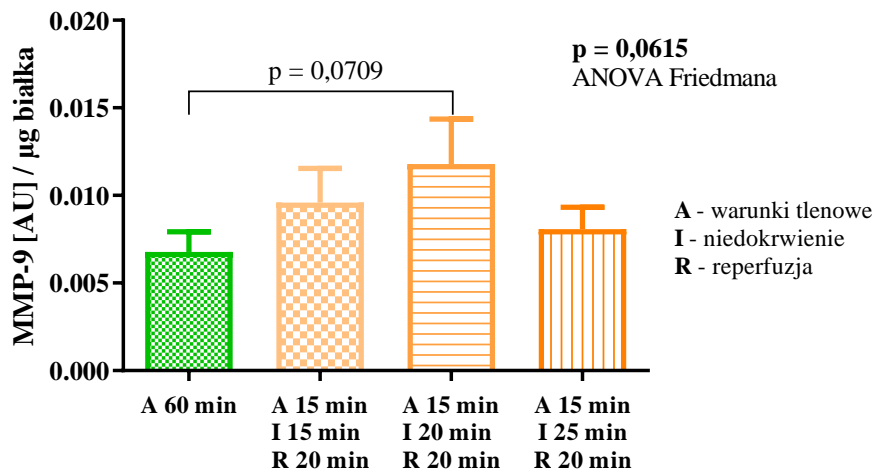
### 4.5. Aktywność MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej

Nie wykryto aktywnej formy MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej metodą zymografii żelatynowej.

### 4.6. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej

W grupie badanej (HCM+PLT) zaobserwowano bardzo silną tendencję do zwiększonej aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,0615$ ), co zaprezentowano na wykresie 42. Wykazano tendencję do wyższej aktywności MMP-9 po I/R z 20 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji w porównaniu do aktywności tej MMP w warunkach tlenowych ( $p = 0,0709$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,1624$ ,  $p = 0,7359$ ).

### Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT)

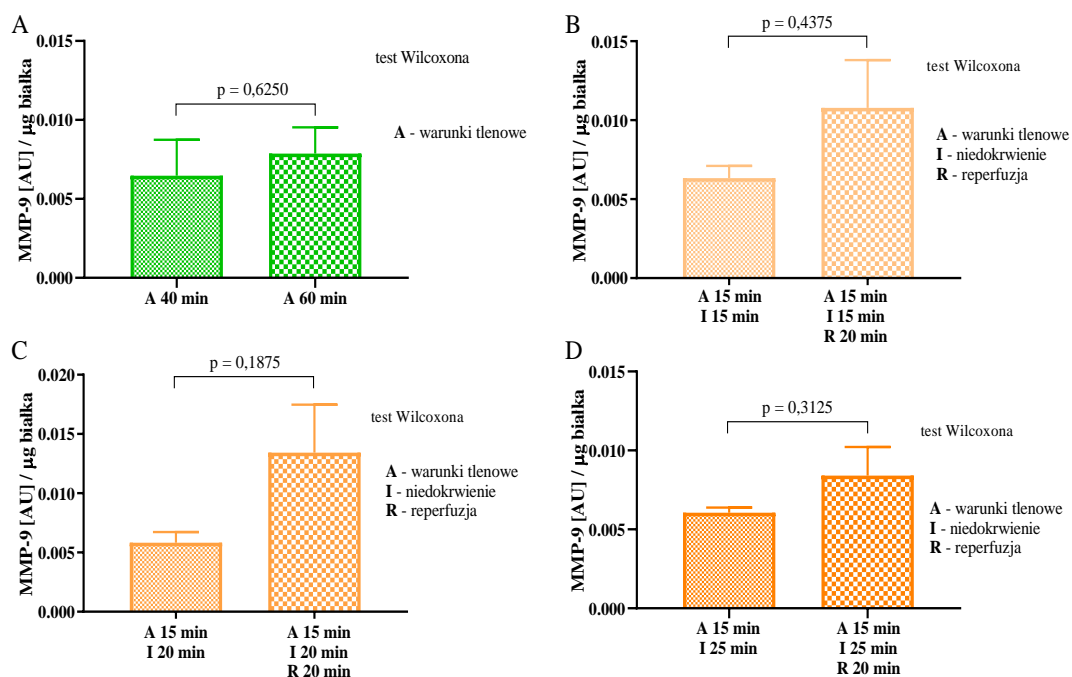


**Wykres 42. Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 8$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 43. Nie wykazano zmian w aktywności MMP-9 zarówno w warunkach tlenowych 40 i 60 minut, jak i po etapie reperfuzji w porównaniu do aktywności MMP-9 po etapie niedokrwienia.

### Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej (HCM)



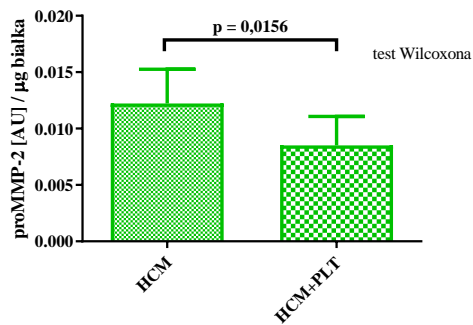
**Wykres 43. Zmiany aktywności MMP-9 w grupie badanej (HCM+PLT): (A) w warunkach tlenowych, (B-D) po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji.**

Zastosowany test: test Wilcoxona,  $n = 5$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

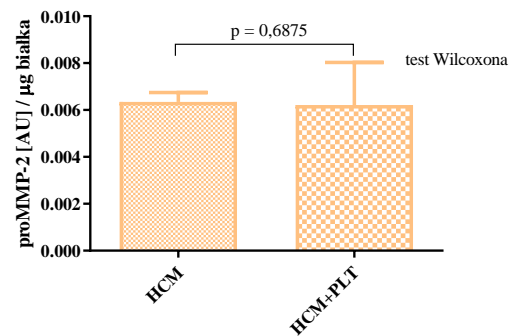
#### 4.7. Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji

Porównanie wyników aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej uzyskanych metodą zymografii żelatynowej w buforach po etapie reperfuzji pomiędzy grupą badaną (HCM) a grupą kontrolną (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 44. Skontaktowanie kardiomiocytów z płytkami krwi powodowało obniżenie aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej zarówno w warunkach tlenowych (wykres 44 A,  $p = 0,0156$ ) jak i w I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją (wykres 44 C,  $p = 0,0313$ ). Zaobserwowano także silną tendencję do obniżenia aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach 25 minutowego niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 44 D,  $p = 0,0781$ ). Jedynie w warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją skontaktowanie kardiomiocytów z płytkami krwi nie zmieniło aktywności proMMP-2 w porównaniu do wyników uzyskanych bez obecności płytek krwi (wykres 44 B,  $p = 0,6875$ ).

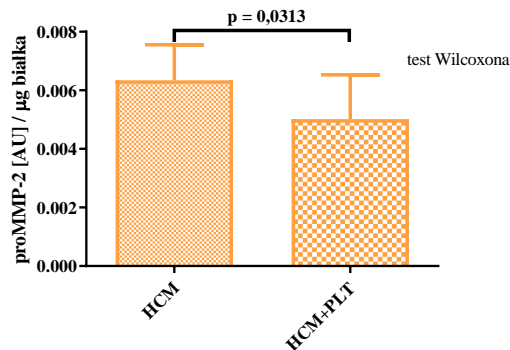
**A** Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach tlenowych 60'



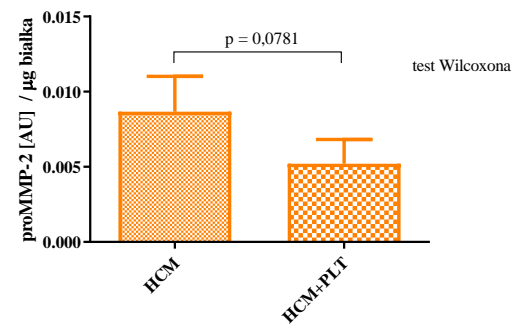
**B** Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach 15' niedotlenienia i 20' reperfuzji



**C** Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach 20' niedotlenienia i 20' reperfuzji



**D** Wpływ płytek krwi na aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach 25' niedotlenienia i 20' reperfuzji



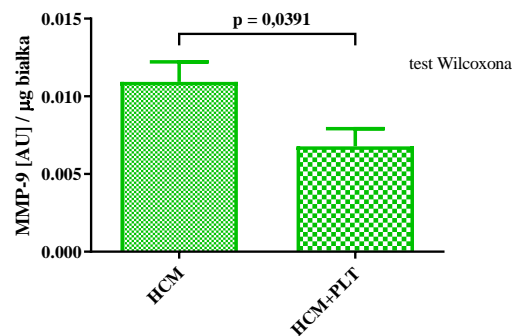
#### Wykres 44. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji.

Porównanie aktywności MMP-2 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxon, n = 7. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej.

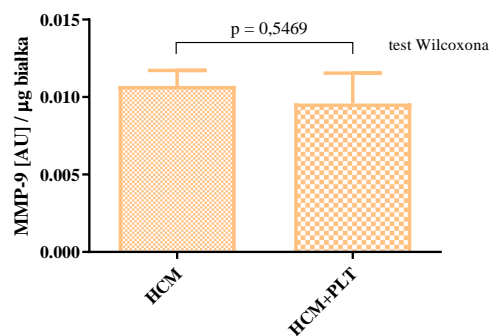
#### 4.8. Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji

Analiza zymogramów aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji wykazała, że skontaktowanie płytek krwi z kardiomiocytami spowodowało obniżenie aktywności MMP-9 jedynie w warunkach tlenowych ( $p = 0,0391$ , wykres 45 A) oraz w warunkach I/R z 25 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji ( $p = 0,0156$ , wykres 45 D). Nie wykazano zmian w aktywności MMP-9 w warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,5469$ , wykres 45 B) oraz 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,7422$ , wykres 45 C).

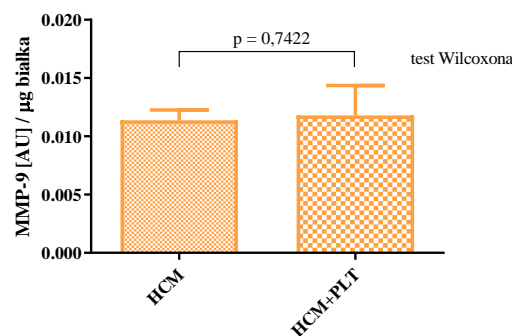
**A** Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach tlenowych 60'



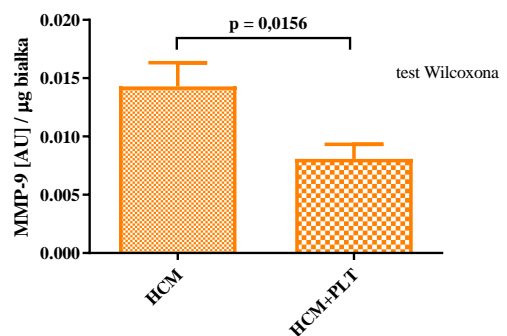
**B** Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach niedotlenienia 15' i reperfuzji 20'



**C** Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach niedokrwienia 20' i reperfuzji 20'



**D** Wpływ płytek krwi na aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach niedokrwienia 25' i reperfuzji 20'

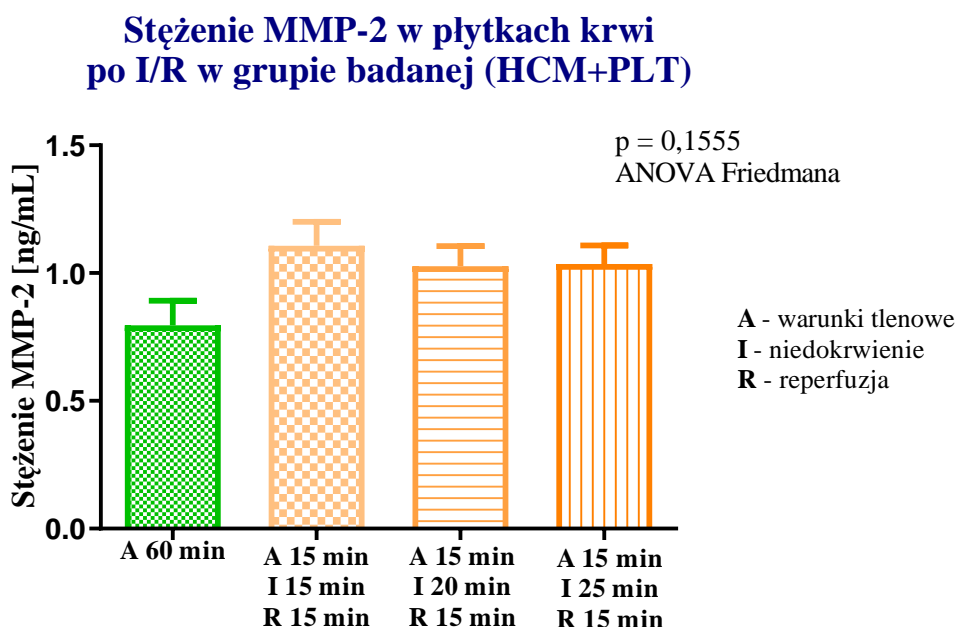


**Wykres 45. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po reperfuzji.**

Porównanie aktywności MMP-9 w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxon, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej.

## 5. Stężenie MMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej

W celu sprawdzenia hipotezy, iż płytki krwi mogą pochłaniać MMP-2 uwolnioną z kardiomiocytów w wyniku I/R oprócz aktywności poszczególnych MMP w płytkach krwi metodą zymografii żelatynowej sprawdzono także stężenie całkowitej MMP-2 (obejmujące zarówno formę proMMP-2 jak i MMP-2) w płytkach krwi. Stężenie całkowitego MMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT) nie ulegało zmianie w wyniku I/R porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,1555$ ). Jednak, jak zaprezentowano na wykresie 46, po I/R stężenie MMP-2 w płytkach krwi było wyższe średnio o 28,99% do 38,91% w porównaniu do warunków tlenowych. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na stężenie MMP-2 w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,6550$ ,  $p = 0,3997$ ).



**Wykres 46. Stężenie MMP-2 w homogenatach płytek krwi po I/R.**

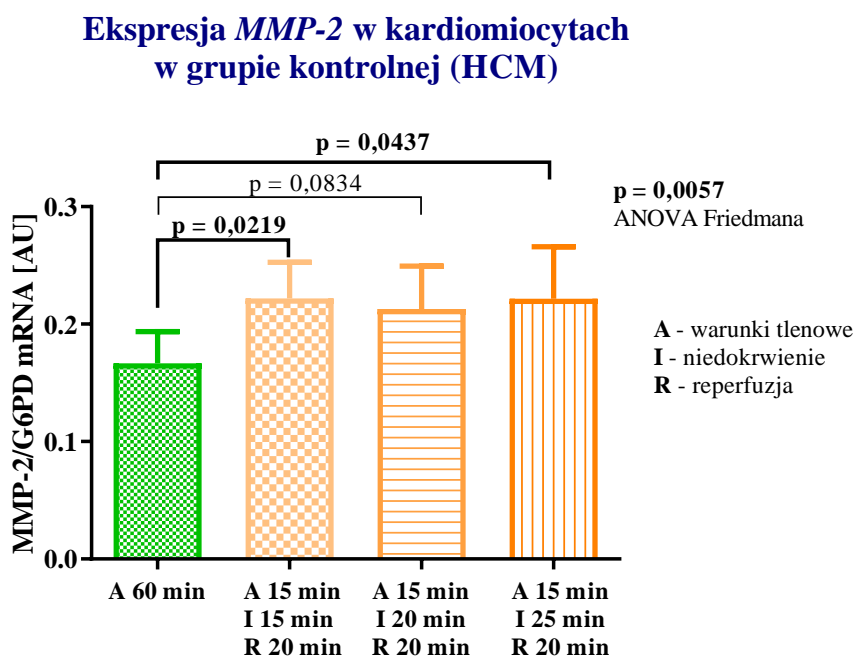
Zastosowany test: ANOVA Friedmana,  $n = 6$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej.



## 6. PCR

### 6.1. Ekspresja genu *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej

Zmiany ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach nieskontaktowanych z płytkami krwi (grupa kontrolna, HCM) przedstawiono na wykresie 47. Zaobserwowano wzrost ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach w warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,0219$ ) oraz 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,0437$ ) w porównaniu do ekspresji *MMP-2* w kardiomiocytach utrzymywanych w warunkach tlenowych. Dodatkowo zaobserwowano wyraźną tendencję do wyższej ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach poddanych 20 minutowemu niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji w porównaniu do ekspresji *MMP-2* w kardiomiocytach utrzymywanych w warunkach tlenowych. Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na ekspresję *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,0003872$ ,  $p = 0,9875$ ).

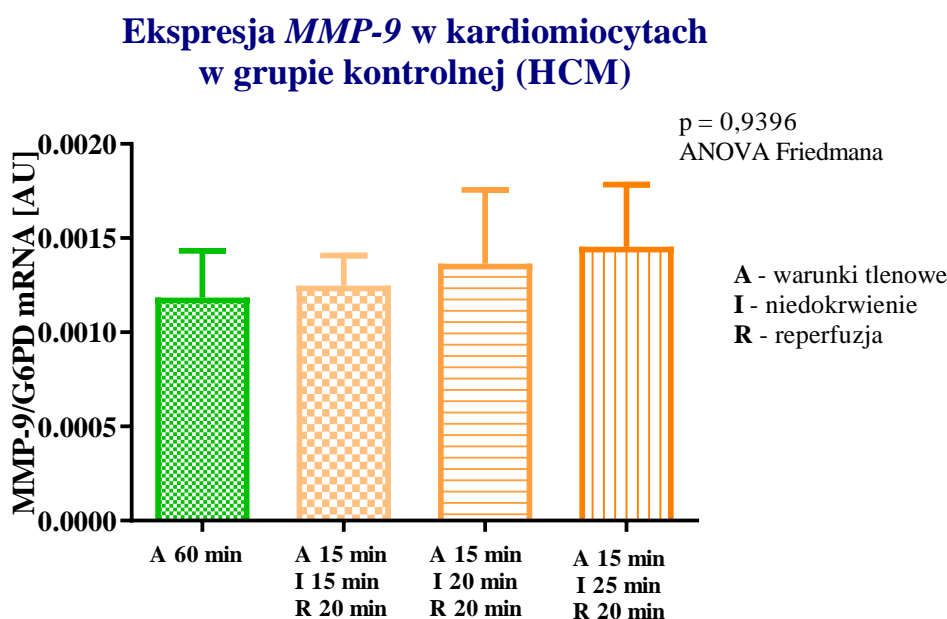


**Wykres 47. Ekspresja genu *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 6$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

## 6.2. Ekspresja genu *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej

Zmiany ekspresji genu *MMP-9* w kardiomiocytach nieskontaktowanych z płytkami krwi (grupa kontrolna, HCM) przedstawiono na wykresie 48. Ekspresja genu *MMP-9* w kardiomiocytach po I/R była podobna do ekspresji w warunkach tlenowych ( $p = 0,9396$ ). Stosując test regresji liniowej wykazano silną tendencję do zwiększonej ekspresji genu *MMP-9* w kardiomiocytach wraz z czasem trwania niedokrwienia ( $R^2 = 0,9935$ ,  $p = 0,0514$ ).

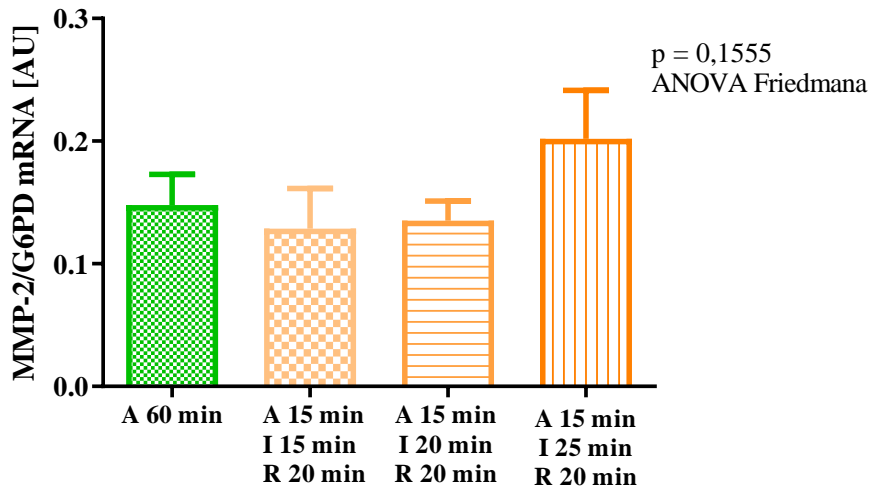


**Wykres 48. Ekspresja genu *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM).** Zastosowany test: test ANOVA Friedmana,  $n = 6$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

## 6.3. Ekspresja genu *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie badanej

Analiza ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi nie wykazała zmian jego ekspresji w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT) w wyniku I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,1555$ ). Jednak widoczny jest wzrost ekspresji genu *MMP-2* dla I/R z 25-minutowym niedokrwieniem o 36,44% w porównaniu do warunków tlenowych (wykres 49). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na ekspresję genu *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,8179$ ,  $p = 0,2806$ ).

### Ekspresja *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT)

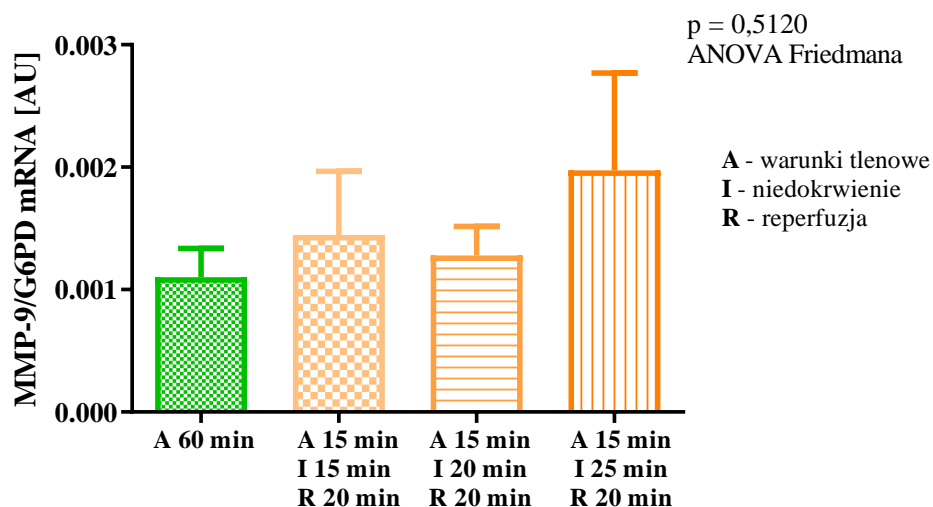


**Wykres 49. Ekspresja genu *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT).** Zastosowany test: ANOVA Friedmana, n = 6. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 6.4. Ekspresja genu *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie badanej

W grupie badanej (HCM+PLT) ekspresja genu *MMP-9* w kardiomiocytach nie uległa zmianie ( $p = 0,5120$ ) pod wpływem I/R w porównaniu do ekspresji tego genu w kardiomiocytach utrzymywanych w warunkach tlenowych (wykres 50). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na ekspresję genu *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,4537$ ,  $p = 0,5295$ ).

### Ekspresja *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT)

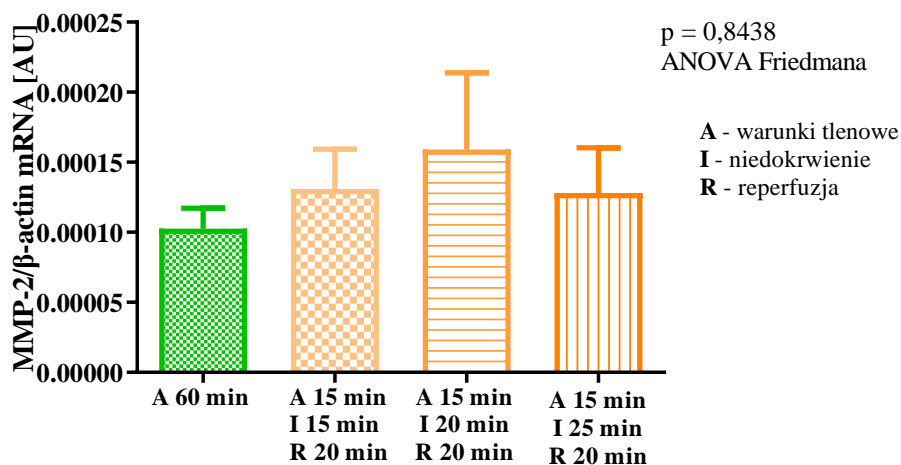


**Wykres 50. Ekspresja genu *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT).**  
Zastosowany test: test ANOVA Friedmana, n = 6. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 6.5. Ekspresja genu *MMP-2* w płytkach krwi w grupie badanej

Zmiany ekspresji genu *MMP-2* w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT) zostały przedstawione na wykresie 51. Ekspresja genu *MMP-2* po I/R była podobna do ekspresji w warunkach tlenowych ( $p = 0,8438$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na ekspresję *MMP-2* w płytkach krwi w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,007172$ ,  $p = 0,9460$ ).

### Ekspresja *MMP-2* w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT)

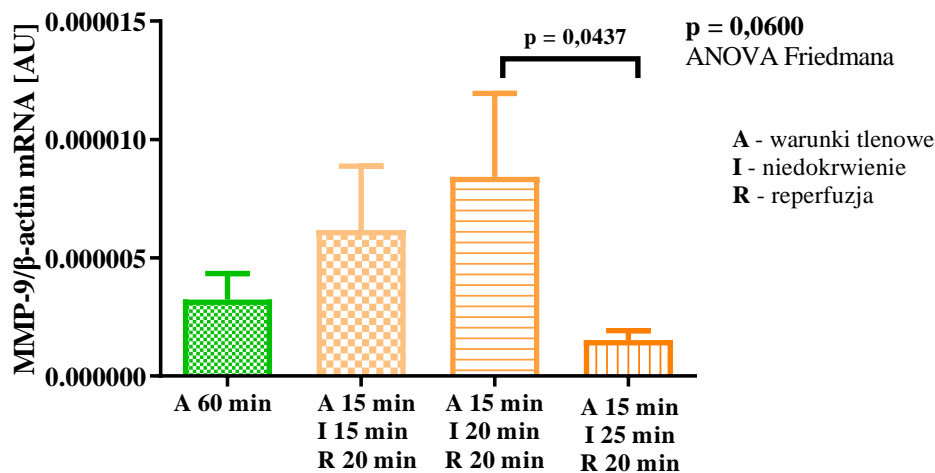


**Wykres 51. Ekspresja genu *MMP-2* w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT).**  
Zastosowany test: test ANOVA Friedmana, n = 6. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 6.6. Ekspresja genu *MMP-9* w płytkach krwi w grupie badanej

Zmiany ekspresji genu *MMP-9* w płytkach krwi w grupie badanej przedstawiono na wykresie 52. Zaobserwowano znaczny spadek ekspresji *MMP-9* po I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją w porównaniu do I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,0437$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na ekspresję *MMP-9* w płytkach krwi w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,4366$ ,  $p = 0,5405$ ).

### Ekspresja *MMP-9* w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT)

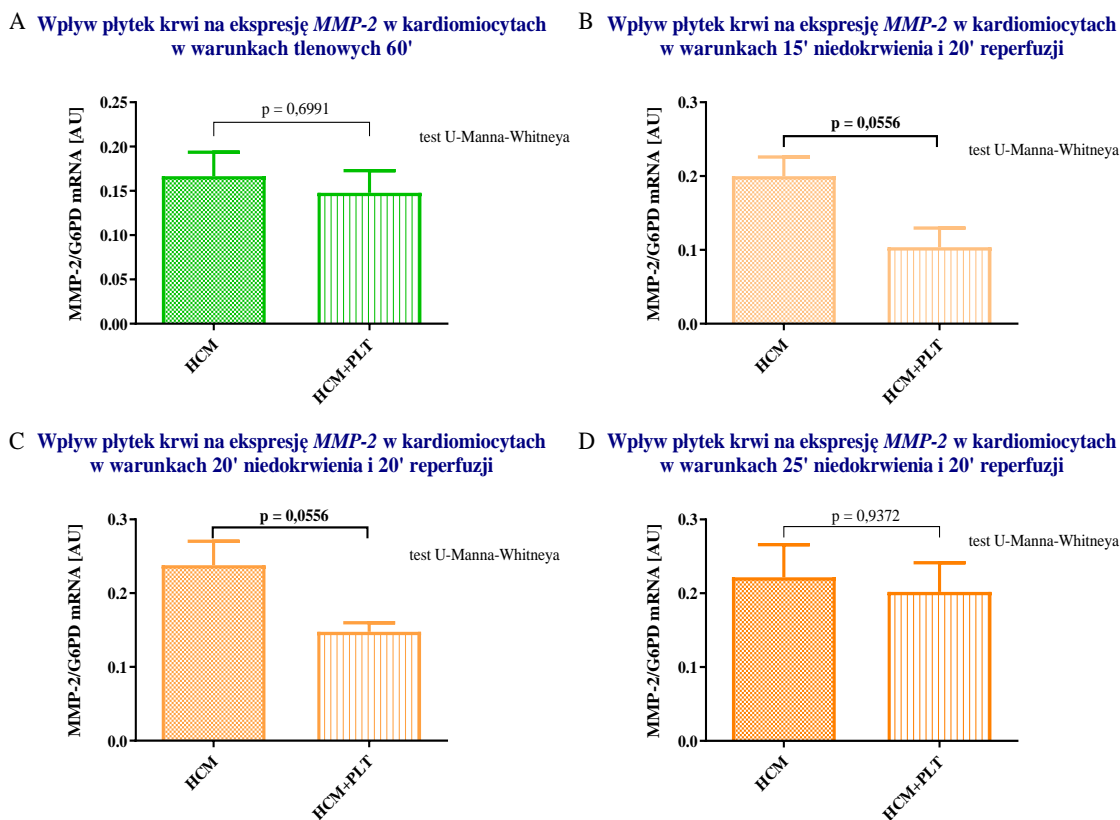


**Wykres 52. Ekspresja genu *MMP-9* w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 6$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

#### 6.7. Analiza wpływu płytek krwi na zmiany ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach

Wpływ płytek krwi na ekspresję genu *MMP-2* w kardiomiocytach przedstawiono na wykresie 53. Nie zaobserwowano zmian w ekspresji genu *MMP-2* kardiomiocytów pod wpływem płytek krwi w warunkach tlenowych ( $p = 0,6991$ ). Natomiast w warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,0556$ ) oraz 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,0556$ ) kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi wykazywały silną tendencję do obniżonej ekspresji genu *MMP-2* w porównaniu do kardiomiocytów w grupie kontrolnej. W kardiomiocytach poddanych I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ekspresja genu *MMP-2* nie uległa zmianie pod wpływem płytek krwi ( $p = 0,9372$ ).

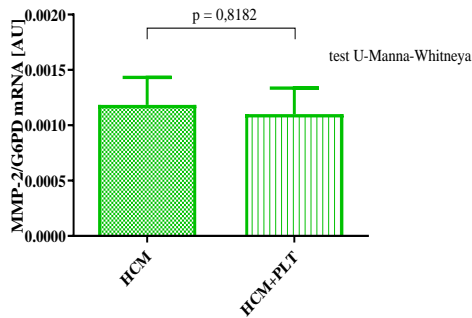


**Wykres 53. Wpływ płytek krwi na zmiany ekspresji genu *MMP-2* kardiomiocytów.** Porównanie ekspresji genu *MMP-2* kardiomiocytów w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min ( $n = 6$ ), (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min ( $n = 5$ ), (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min ( $n = 5$ ), (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min ( $n = 6$ ). Zastosowany test: test U-Manna-Whitneya. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej.

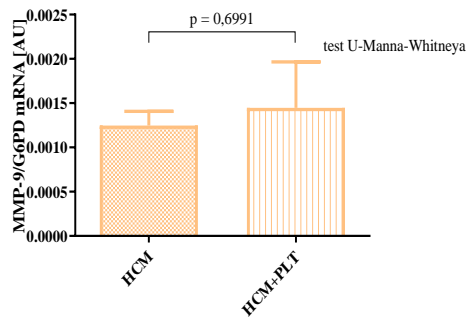
## 6.8. Analiza wpływu płytek krwi na zmiany ekspresji genu *MMP-9* w kardiomiocytach

Wpływ płytek krwi na ekspresję genu *MMP-9* kardiomiocytów w grupie badanej i grupie kontrolnej przedstawiono na wykresie 54. Skontaktowanie kardiomiocytów z płytkami krwi (HCM+PLT) nie wpływało na zmiany ekspresji genu *MMP-9* w kardiomiocytach w porównaniu do ekspresji tego genu w kardiomiocytach nieskontaktowanych z płytkami krwi (HCM) zarówno w warunkach tlenowych ( $p = 0,8182$ ), jak i w warunkach I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,6991$ ), 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,9372$ ) oraz 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją ( $p = 0,9372$ ).

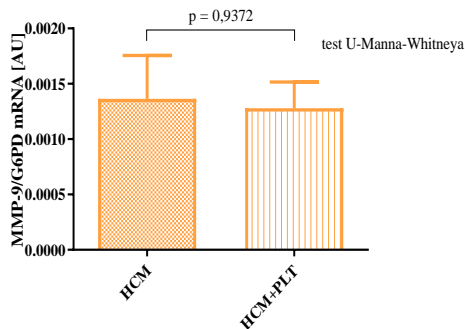
A Wpływ płytek krwi na ekspresję *MMP-9* w kardiomiocytach w warunkach tlenowych 60'



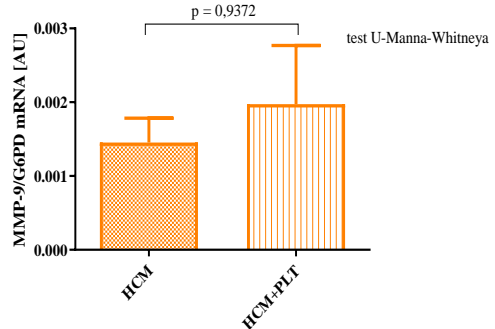
B Wpływ płytek krwi na ekspresję *MMP-9* w kardiomiocytach w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji



C Wpływ płytek krwi na ekspresję *MMP-9* w kardiomiocytach w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji



D Wpływ płytek krwi na ekspresję *MMP-9* w kardiomiocytach w warunkach 25' niedokrwienia i 20' reperfuzji



**Wykres 54. Wpływ płytek krwi na zmiany ekspresji genu *MMP-9* w kardiomiocytach.**

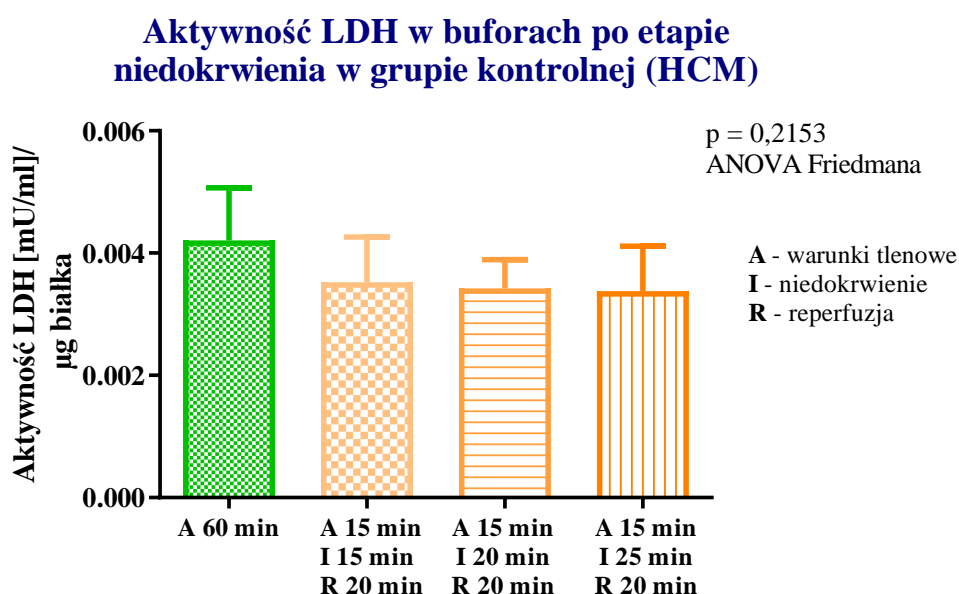
Porównanie ekspresji genu *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test U-Manna-Whitneya, n = 6. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędów standardowych średniej.



## 7. Aktywność LDH

### 7.1. Aktywność LDH po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej

Na wykresie 55 przedstawiono aktywność LDH oznaczonej w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupie kardiomiocytów nieskontaktowanych z płytkami krwi (HCM). Nie wykazano zmian w aktywności LDH po etapie niedokrwienia w porównaniu do aktywności LDH w warunkach tlenowych ( $p = 0,2153$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na aktywność LDH po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,9453$ ,  $p = 0,1503$ ).



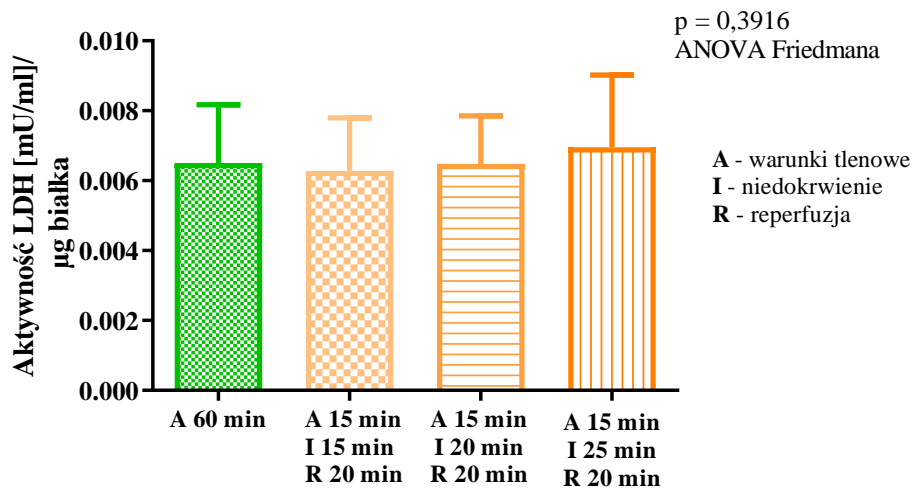
**Wykres 55. Zmiany aktywności LDH w grupie kontrolnej (HCM).**

Zastosowany test: test ANOVA Friedmana,  $n = 9$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

### 7.2. Aktywność LDH po etapie niedokrwienia w grupie badanej

Wykres 56 przedstawia aktywność LDH, oznaczoną w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupie kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (HCM+PLT). Niedokrwienie, niezależnie od czasu jego trwania, nie spowodowało zmian aktywności LDH w grupie badanej ( $p = 0,3916$ ). Nie wykazano wpływu czasu niedokrwienia na aktywność LDH po etapie niedokrwienia w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,9484$ ,  $p = 0,1459$ ).

### Aktywność LDH w buforach po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT)

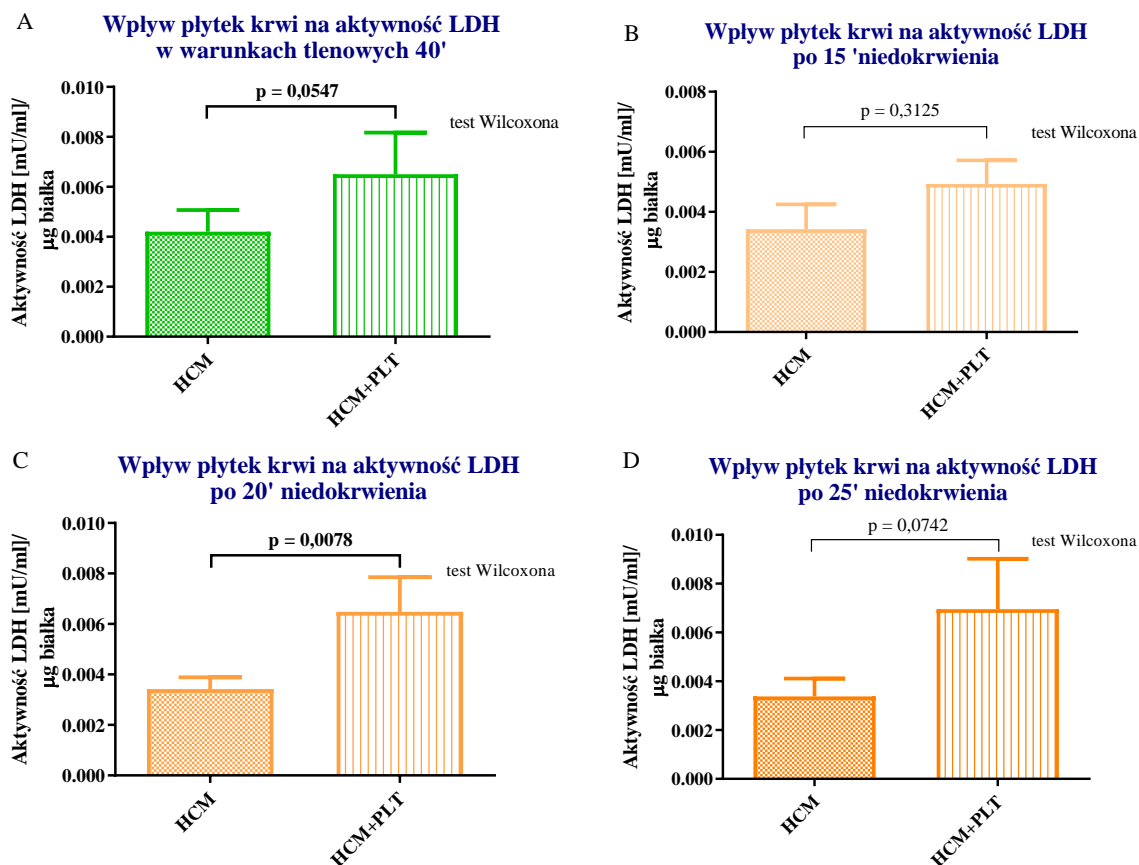


**Wykres 56. Zmiany aktywności LDH w buforach po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: test ANOVA Friedmana, n = 9. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

### 7.3. Wpływ płytek krwi na aktywność LDH

Wykres 57 przedstawia aktywność LDH oznaczoną w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (HCM) i grupie badanej (HCM+PLT). Zaobserwowano wyższą aktywność LDH w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej zarówno w warunkach tlenowych, jak i niedokrwienia. Aktywność LDH w buforach w warunkach tlenowych (wykres 57 A) była o 54,68% wyższa po skontaktowaniu kardiomiocytów z płytkami krwi (p = 0,0547) w porównaniu do grupy kontrolnej. Jak przedstawiono na wykresie 57 B w buforach zebranych po 15 minutowym niedokrwieniu obecność płytek krwi spowodowała wzrost aktywności LDH średnio o 44,13% w porównaniu do grupy kontrolnej (p = 0,3125). Aktywność LDH oznaczona w buforach zebranych po 20 (p = 0,0078) oraz 25 (p = 0,0742) minutowym niedokrwieniu była ponad 2-krotnie wyższa w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 57 C-D).



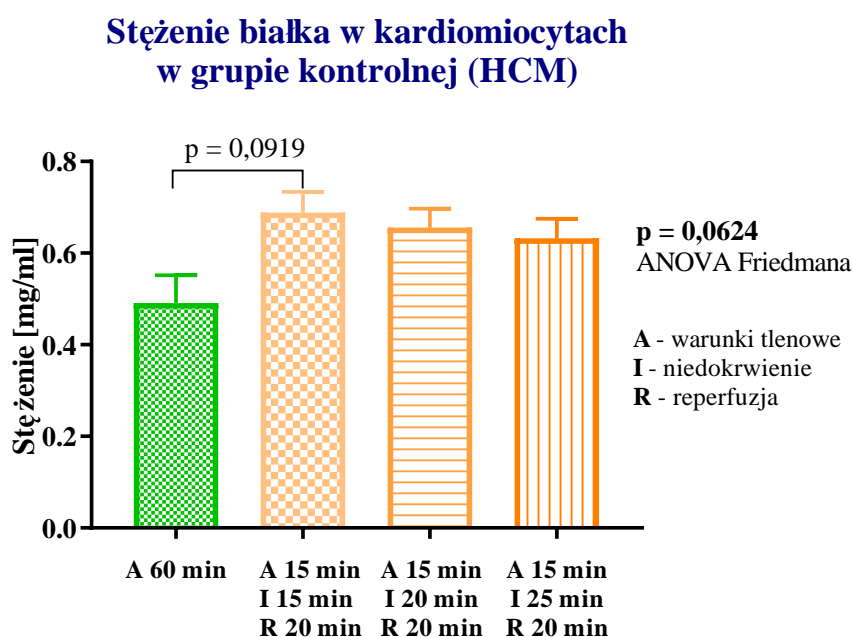
**Wykres 57. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności LDH w buforach po etapie niedokrwienia.**

Porównanie aktywności LDH w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)) w warunkach tlenowych (A), po 15 minutach niedokrwienia (B), 20 minutach niedokrwienia (C) oraz 25 minutach niedokrwienia (D). Zastosowany test: test Wilcoxon,  $n = 9$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej.

## 8. Stężenie białka całkowitego w homogenatach komórkowych

### 8.1. Stężenie białka w kardiomiocytach w grupie kontrolnej

Stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach w grupie kontrolnej przedstawiono na wykresie 58. Wykazano tendencję do wyższego stężenia białka całkowitego w kardiomiocytach po I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,0624$ ).

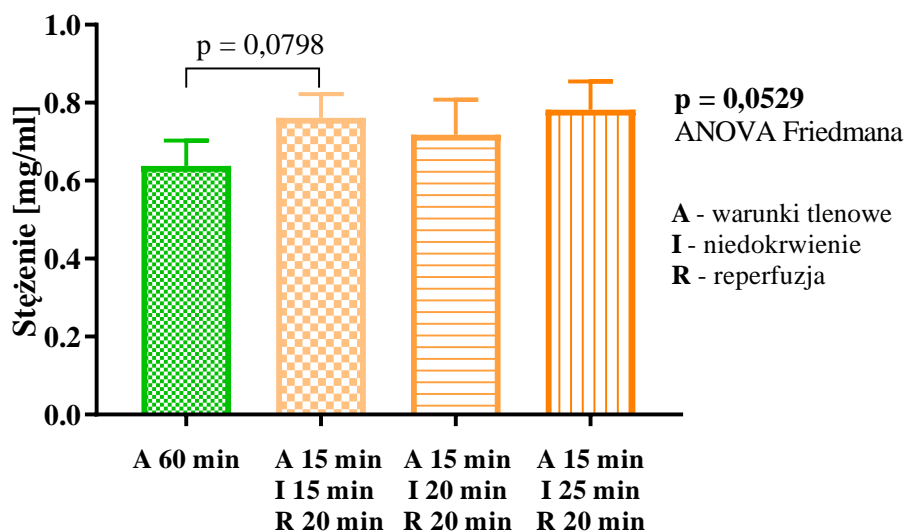


**Wykres 58. Stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM).** Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 10$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

### 8.2. Stężenie białka w kardiomiocytach w grupie badanej

Stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami krwi (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 59. Wykazano silną tendencję do wyższej ekspresji białka w kardiomiocytach poddanych I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,0529$ ).

### Stężenie białka w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT)



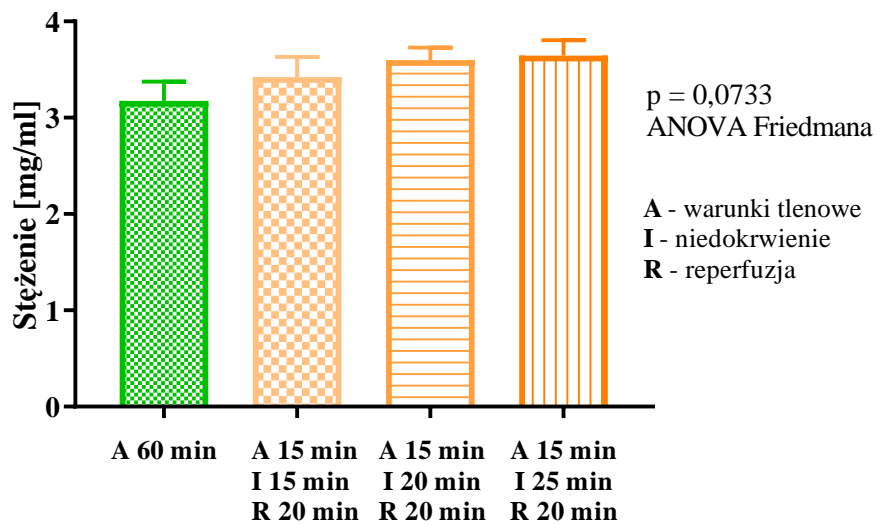
**Wykres 59. Stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT).**

Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 11$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

### 8.3. Stężenie białka w płytkach krwi w grupie badanej

Stężenie białka całkowitego w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 60. Wykazano tendencję do wyższego stężenia białka całkowitego w płytkach krwi poddanych I/R w porównaniu do płytek krwi utrzymywanych w warunkach tlenowych ( $p = 0,0733$ ).

### Stężenie białka w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT)

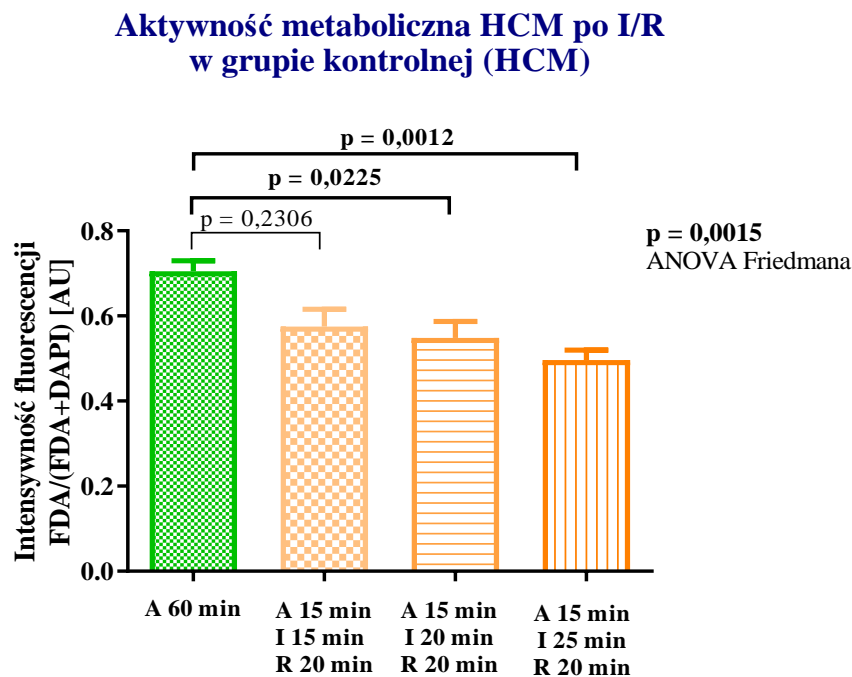


**Wykres 60. Stężenie białka całkowitego w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT).** Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami, n = 12. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

## 9. Ocena aktywności metabolicznej kardiomiocytów

### 9.1. Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w grupie kontrolnej

Aktywność metaboliczną kardiomiocytów, ocenioną w barwieniu fluorescencyjnym FDA/DAPI w grupie kontrolnej (HCM), przedstawiono na wykresie 61. Kardiomiocyty poddane I/R wykazywały niższą aktywność metaboliczną w porównaniu do kardiomiocytów utrzymywanych w warunkach tlenowych o 18,38% (dla I/R z 15 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją,  $p = 0,2306$ ), 29,19% (dla I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją,  $p = 0,0225$ ) oraz 29,55% (dla I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją,  $p = 0,0012$ ). Jednak w teście regresji liniowej nie wykazano zależności liniowej zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów od czasu trwania niedokrwienia ( $R^2 = 0,9672$ ,  $p = 0,1159$ ).

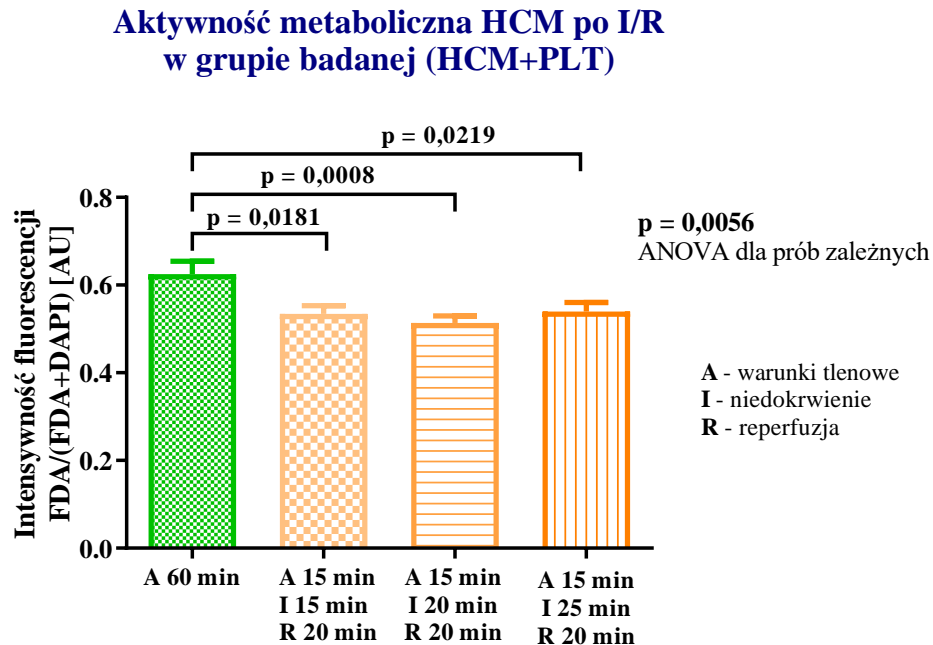


**Wykres 61. Zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM).** Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 7$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, I/R – niedokrwienie/reperfuzja.

### 9.2. Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w grupie badanej

Jak przedstawiono na wykresie 62, aktywność metaboliczna kardiomiocytów uległa obniżeniu we wszystkich rozpatrywanych czasach niedokrwienia i reperfuzji w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,0056$ ). W teście regresji liniowej

wykazano, że czas niedokrwienia nie miał liniowego wpływu na aktywność metaboliczną kardiomiocytów w grupie badanej ( $R^2 = 0,7806$ ,  $p = 0,1165$ ).



**Wykres 62. Zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie badanej (HCM+PLT).**

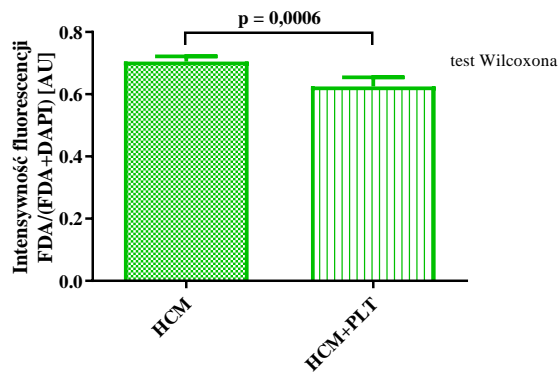
Zastosowany test: ANOVA Friedmana oraz test post-hoc – test Dunna, w celu wykazania różnic pomiędzy grupami,  $n = 14$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, I/R – niedokrwienie/reperfuzja, PLT – płytki krwi.

### 9.3. Wpływ płytek krwi na aktywność metaboliczną kardiomiocytów

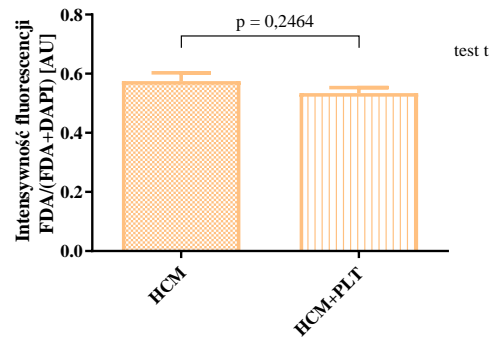
Wpływ płytek krwi na aktywność metaboliczną kardiomiocytów zobrazowano na wykresie 63. W warunkach tlenowych (wykres 63 A) płytki krwi spowodowały obniżenie aktywności metabolicznej kardiomiocytów o 11,32% ( $p = 0,0006$ ). W warunkach I/R z 15 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji ( $p = 0,2464$ ) oraz 20 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji ( $p = 0,1410$ ) obecność płytek krwi nie wpływała istotnie na aktywność metaboliczną kardiomiocytów, co pokazano na wykresie 63 B, C. Natomiast przy przedłużającym się niedokrwieniu płytki krwi działały ochronnie na metabolizm kardiomiocytów (wykres 63 D). W I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją obecność płytek krwi wpływała na zwiększenie aktywności metabolicznej kardiomiocytów o 8,72% w porównaniu do komórek kontrolnych ( $p = 0,0140$ ).



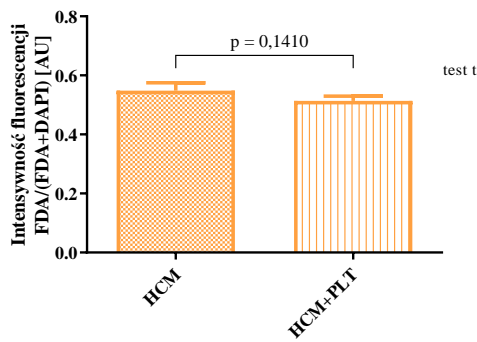
**A Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w warunkach tlenowych 60'**



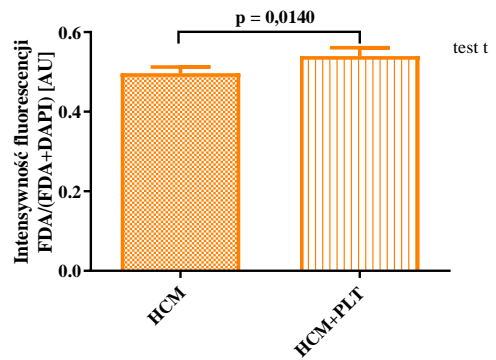
**B Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji**



**C Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji**



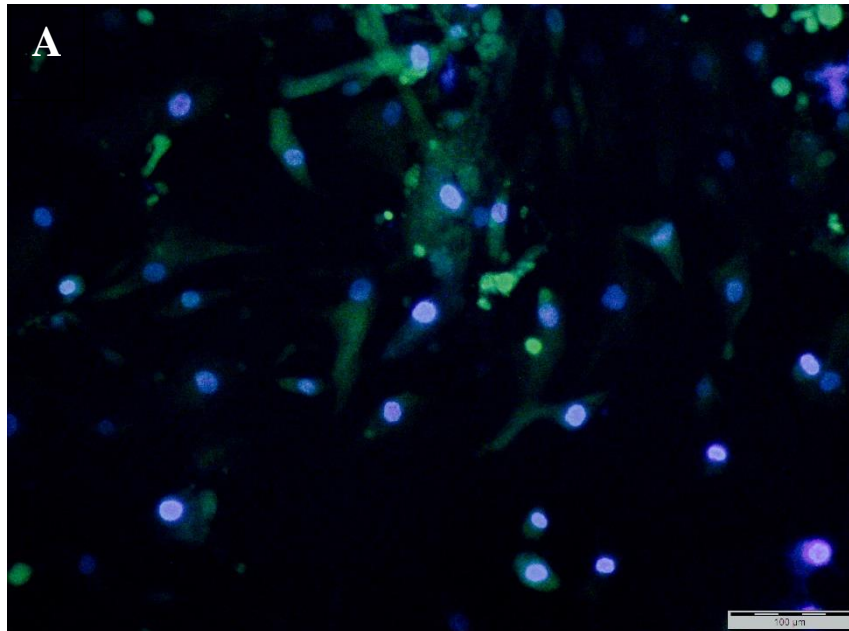
**D Aktywność metaboliczna kardiomiocytów w warunkach 25' niedokrwienia i 20' reperfuzji**



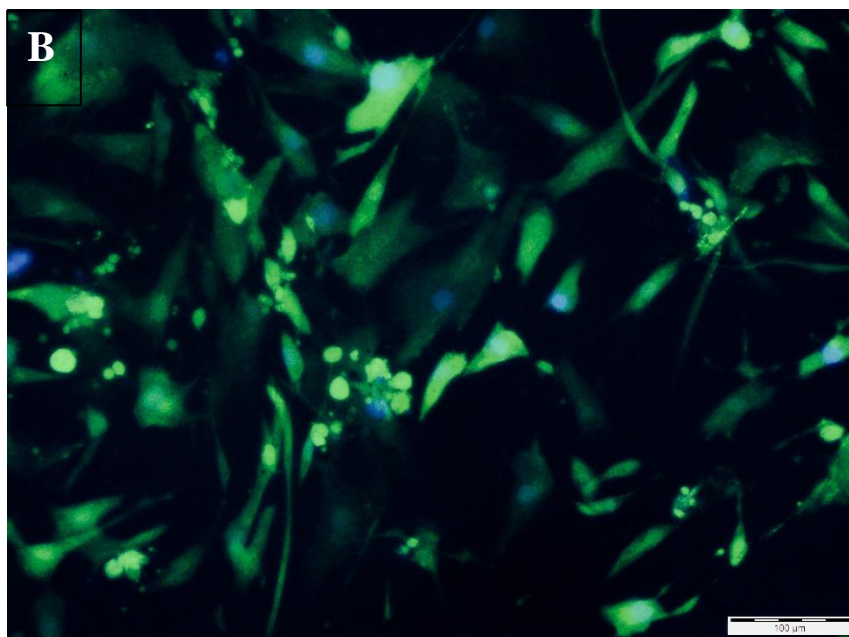
**Wykres 63. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów.**

Porównanie aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM) i grupie badanej (HCM+PLT). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxona lub test t dla prób zależnych, n = 14. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej.

Rycina 8 przedstawia reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe, obrazujące wpływ płytek krwi na metabolizm kardiomiocytów po I/R z 25 minutami niedokrwienia w grupie kontrolnej (A) oraz w grupie badanej (B).



Grupa kontrolna  
(HCM)



Grupa badana  
(HCM+PLT)

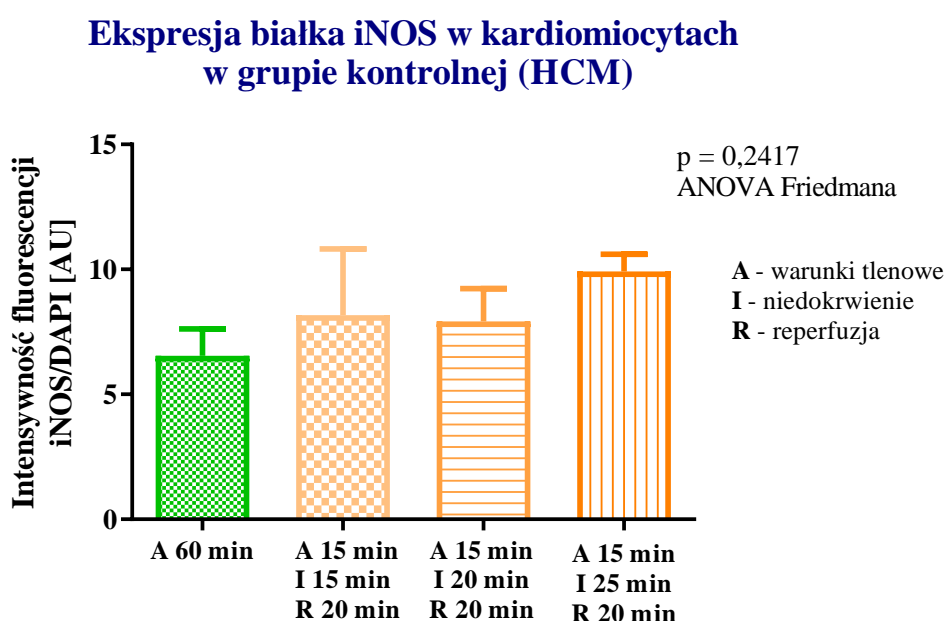
**Rycina 8. Barwienie fluorescencyjne FDA/DAPI.**

Reprezentatywne obrazy ludzkich kardiomiocytów (HCM) w grupie kontrolnej po I/R 25' (A) oraz w grupie badanej po I/R 25' (B) (HCM po kontakcie z płytkami krwi). Barwienie dioctanem fluoresceiny – odzwierciedla aktywność metaboliczną komórek (kanał zielony) oraz 4',6-diamidyno-2-fenyloindolem – odzwierciedla jądrowy materiał genetyczny (kanał niebieski).

## 10. Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach

### 10.1. Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach grupy kontrolnej

Wykres 64 przedstawia ekspresję iNOS w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM). Ekspresja iNOS nie uległa zmianie w warunkach I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,2417$ ). Jednak po 25 minutach niedokrwienia i 20 minutach reperfuzji ekspresja iNOS była wyższa średnio o 48,51% w porównaniu do średniej ekspresji iNOS uzyskanej w warunkach tlenowych. Nie wykazano wpływu czasu trwania niedokrwienia na ekspresję iNOS w kardiomiocytach w grupie kontrolnej w teście ekspresji liniowej ( $R^2 = 0,6456$ ,  $p = 0,4059$ ).

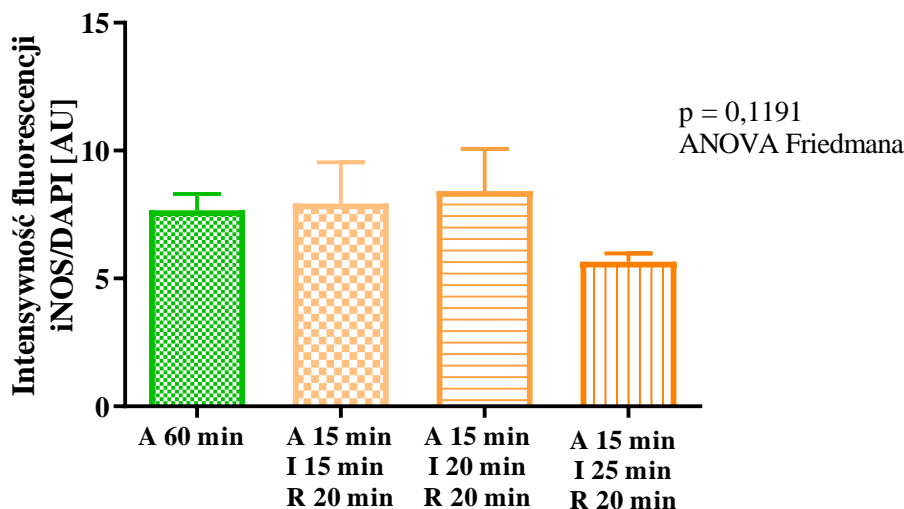


**Wykres 64. Zmiany ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM).** Zastosowany test: test ANOVA Friedmana,  $n = 4$ . Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błędu standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty.

### 10.2. Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej

W grupie badanej (HCM+PLT) nie zaobserwowano zmian ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach po I/R w porównaniu do warunków tlenowych ( $p = 0,1191$ ). Jednak, jak zaprezentowano na wykresie 65, ekspresja iNOS po I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją była średnio o 26,20% niższa niż średnia ekspresja iNOS uzyskana w warunkach tlenowych. Nie wykazano wpływu czasu trwania niedokrwienia na ekspresję iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej w teście regresji liniowej ( $R^2 = 0,5949$ ,  $p = 0,4392$ ).

### Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT)

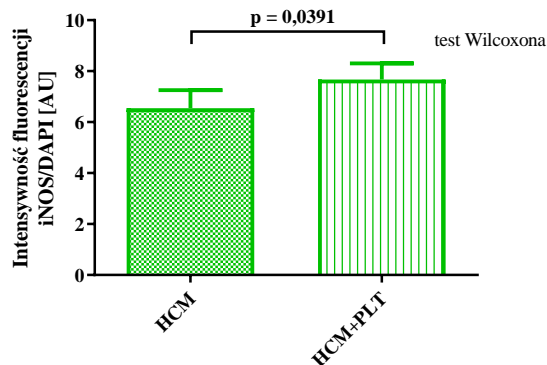


**Wykres 65. Zmiany ekspresji iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT).** Zastosowany test: test ANOVA Friedmana, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej. HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.

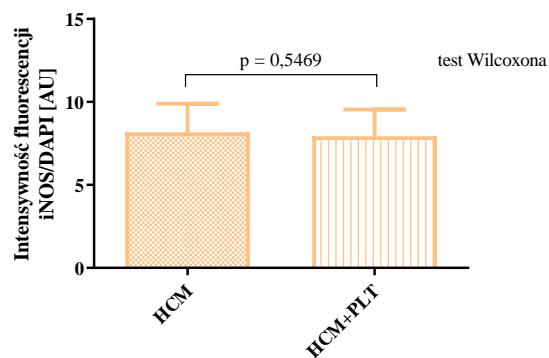
### 10.3. Wpływ płytek krwi na ekspresję białka iNOS w kardiomiocytach

Porównanie ekspresji iNOS w kardiomiocytach bez obecności płytek krwi (grupa kontrolna, HCM) i w obecności płytek krwi (grupa badana, HCM+PLT) przedstawiono na wykresie 66. W warunkach tlenowych w obecności płytek krwi zaobserwowano zwiększenie ekspresji iNOS w kardiomiocytach w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,0391$ ), co zaprezentowano na wykresie 66 A. Jednak obecność płytek krwi nie spowodowała zmian ekspresji iNOS w kardiomiocytach po I/R z 15 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji ( $p = 0,5469$ ) i I/R z 20 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji ( $p = 0,6406$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej (wykres 66 B–C). Co ważne, po I/R z 25 minutami niedokrwienia i 20 minutami reperfuzji ekspresja iNOS w kardiomiocytach uległa obniżeniu w obecności płytek krwi w porównaniu do kardiomiocytów bez kontaktu z płytkami krwi ( $p = 0,0078$ , wykres 66 D).

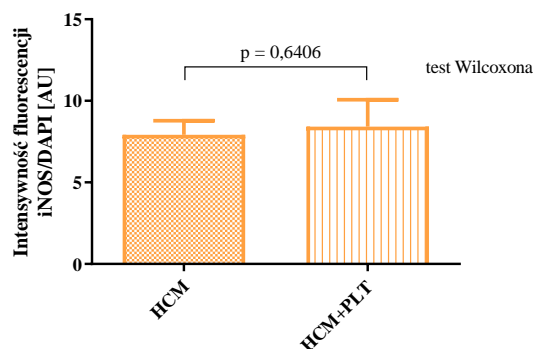
**A** Ekspresja białka iNOS w kardiomiocytach w warunkach tlenowych 60'



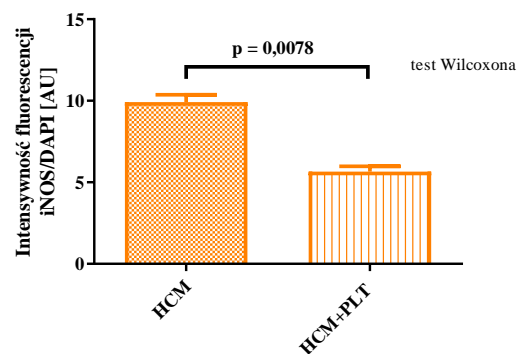
**B** Ekspresja iNOS w kardiomiocytach w warunkach 15' niedokrwienia i 20' reperfuzji



**C** Ekspresja iNOS w kardiomiocytach w warunkach 20' niedokrwienia i 20' reperfuzji



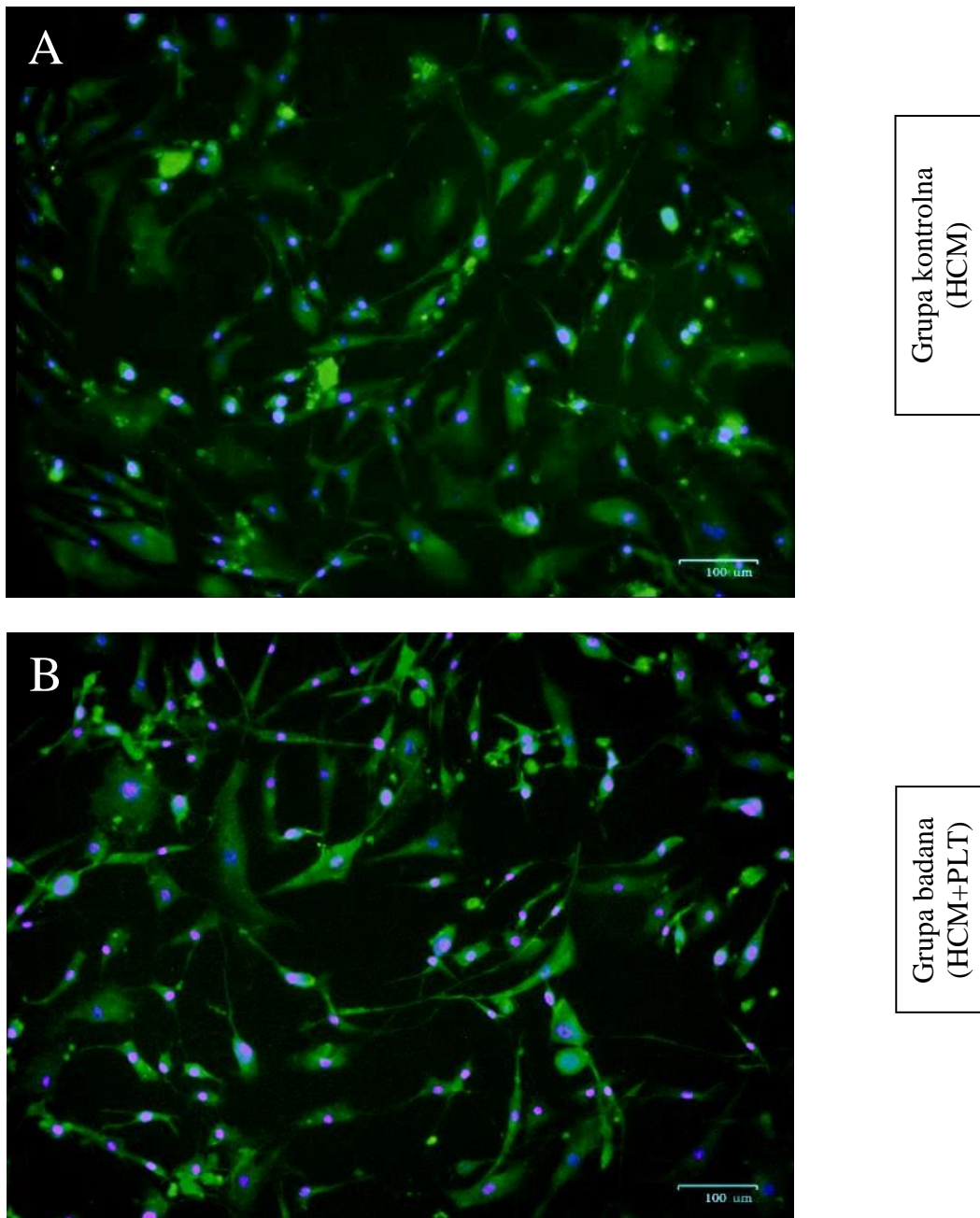
**D** Ekspresja iNOS w kardiomiocytach w warunkach 25' niedokrwienia i 20' reperfuzji



**Wykres 66. Wpływ obecności płytek krwi na zmiany w ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach.**

Porównanie ekspresji iNOS w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (ludzkie kardiomiocyty (HCM) bez kontaktu z płytkami krwi) i grupie badanej (ludzkie kardiomiocyty skontaktowane z płytkami krwi (HCM+PLT)). (A) warunki tlenowe 60 min, (B) niedokrwienie 15 min/reperfuzja 20 min, (C) niedokrwienie 20 min/reperfuzja 20 min, (D) niedokrwienie 25 min/reperfuzja 20 min. Zastosowany test: test Wilcoxon, n = 8. Słupki przedstawiają wartość średnią, wąsy odnoszą się do błęd standardowego średniej.

Rycina 9. przedstawia reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe obrazujące ekspresję iNOS w kardiomiocytach po I/R 25' w grupie kontrolnej (A) oraz grupie badanej (B).



**Rycina 9. Barwienie fluorescencyjne iNOS/DAPI.**

Reprezentatywne obrazy hodowli ludzkich kardiomiocytów (HCM) wyznakowanych przeciwciałami anti-iNOS – odzwierciedla ekspresję białka iNOS (kanał zielony) oraz DAPI – odzwierciedla jądrowy materiał genetyczny (kanał niebieski). (A) HCM po I/R z 25 min niedokrwienia i 20 min reperfuzji, (B) HCM w obecności płytek krwi po I/R z 25 min niedokrwienia i 20 min reperfuzji.

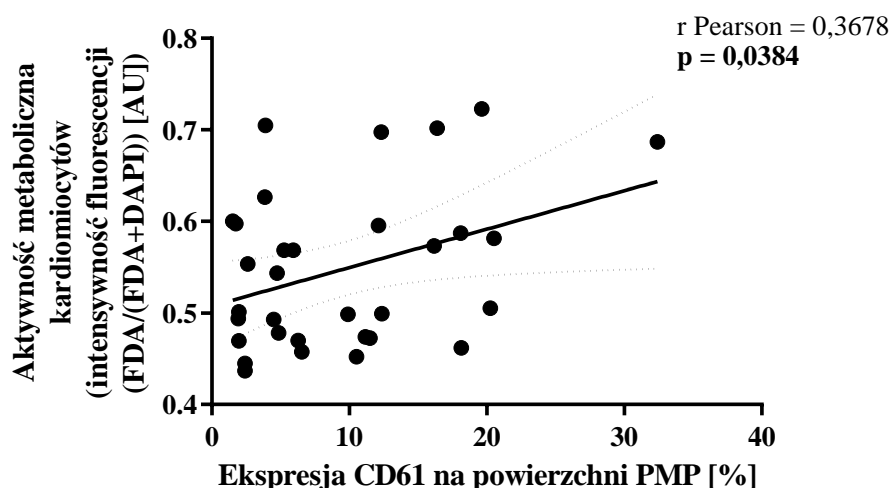


## 11. Związek PMP z badanymi parametrami kardiomiocytów

W celu sprawdzenia hipotezy na temat związku PMP z uszkodzeniem lub ochroną kardiomiocytów w warunkach chemicznego I/R skorelowano ze sobą ekspresję CD61 na powierzchni PMP (jako wykładnika liczby PMP) z: ekspresją iNOS w kardiomiocytach (jako białka biorącego udział w mechanizmie uszkodzenia kardiomiocytów w wyniku działania ROS), aktywnością metaboliczną kardiomiocytów (jako wykładnika żywotności komórek) oraz aktywnością LDH w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia (jako markera uszkodzenia komórek). W przeprowadzonych badaniach umiarkowanie silną dodatnią korelację stwierdzono pomiędzy ekspresją CD61+ na powierzchni PMP a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów ( $r = 0,3678$ ;  $p = 0,0384$ ), co przedstawiono na rycinie 10. Nie stwierdzono koincydencji pomiędzy PMP CD61+ a ekspresją iNOS w kardiomiocytach oraz aktywnością LDH kardiomiocytów (tabela 2).

**Tabela 2. Współczynniki korelacji rang Spearmana (<sup>S</sup>) / Pearsona (<sup>P</sup>) dla PMP CD61+ i ekspresji iNOS w kardiomiocytach, aktywności metabolicznej kardiomiocytów oraz aktywności LDH w przestrzeni pozakomórkowej (po etapie niedokrwienia) w grupie badanej.**

Korelacje	Ekspresja iNOS w kardiomiocytach	Aktywność metaboliczna kardiomiocytów	Aktywność LDH w przestrzeni pozakomórkowej
PMP CD61+	$r = 0,1104$ ; $p = 0,5477$ <sup>S</sup>	<b><math>r = 0,3678</math>;</b> <b><math>p = 0,0384</math></b> <sup>P</sup>	$r = 0,08836$ ; $p = 0,6306$ <sup>S</sup>

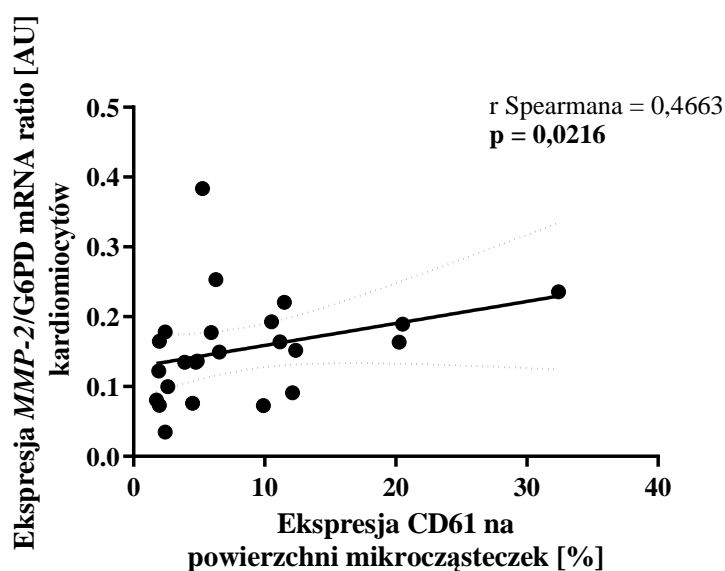


**Rycina 10. Diagram korelacji pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów w grupie badanej.**

Dodatkowo, aby ocenić związek pomiędzy ekspresją genów oraz aktywnością MMP-2 i MMP-9 w kardiomiocytach z uwalnianymi PMP, skorelowano ekspresję CD61 na powierzchni PMP z ekspresją genów i aktywnością MMP w kardiomiocytach grupy badanej. Wyniki przedstawiono w tabeli 3. Stwierdzono umiarkowanie silną dodatnią zależność ( $r = 0,4663$ ;  $p = 0,0216$ ) pomiędzy PMP CD61+ a ekspresją genu dla *MMP-2* w kardiomiocytach (tabela 3), co przedstawiono na rycinie 11.

**Tabela 3. Współczynniki korelacji rang Spearmana (<sup>S</sup>) lub Pearsona (<sup>P</sup>) dla PMP CD61 i MMP-2 oraz MMP-9 kardiomiocytów w grupie badanej.**

Korelacja		
		PMP CD61+
Aktywność w kardiomiocytach	pro-MMP-2	$r = -0,1180$ ; $p = 0,5202$ <sup>P</sup>
	MMP-2	$r = -0,2332$ ; $p = 0,1990$ <sup>S</sup>
	MMP-9	$r = 0,1060$ ; $p = 0,5638$ <sup>S</sup>
Ekspresja genu w kardiomiocytach	<i>MMP-2</i>	<b><math>r = 0,4663</math>; <math>p = 0,0216</math></b> <sup>S</sup>
	<i>MMP-9</i>	$r = 0,1592$ ; $p = 0,4575$ <sup>S</sup>



**Rycina 11. Diagram korelacji pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a ekspresją genu *MMP-2* kardiomiocytów w grupie badanej.**

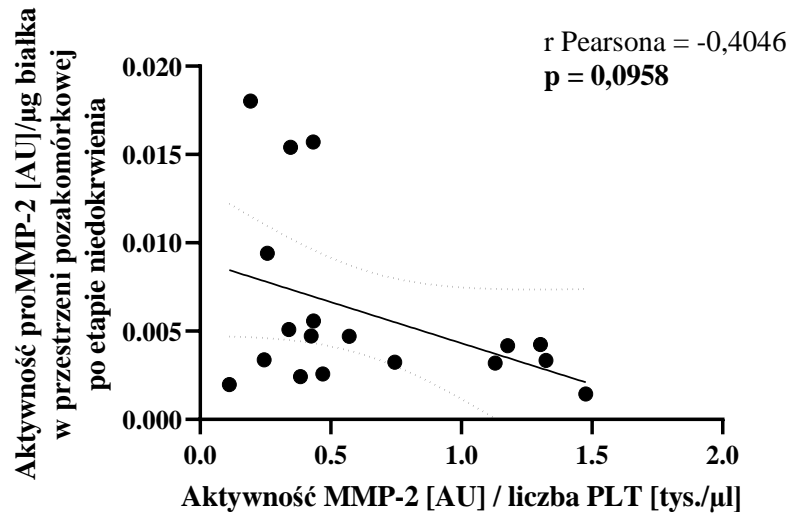


## 12. Zależności aktywności, stężenia i ekspresji genów MMP-2 i MMP-9 pomiędzy płytkami krwi a kardiomiocytami

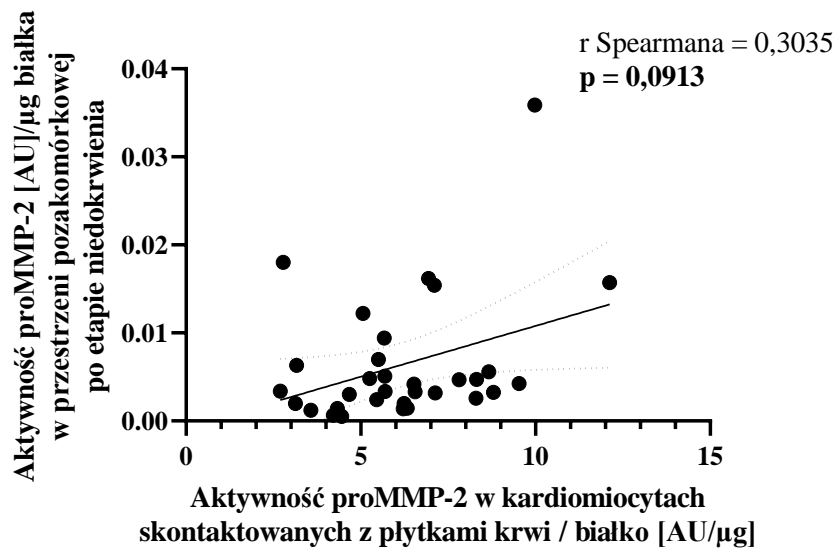
W celu sprawdzenia hipotezy, że komórki mogą uwalniać MMP do przestrzeni pozakomórkowej lub pochłaniać MMP z przestrzeni pozakomórkowej sprawdzono zależność pomiędzy aktywnością MMP-2 i MMP-9 w komórkach a aktywnością odpowiednio proMMP-2 i MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej. Wyniki przedstawiono w tabeli 4. Stwierdzono tendencję do umiarkowanie silnej ujemnej korelacji aktywności MMP-2 w płytkach krwi z aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej zarówno po etapie niedokrwienia ( $r = -0,4046$ ,  $p = 0,0958$ , rycina 12), jak i po etapie reperfuzji ( $r = -0,3304$ ,  $p = 0,0993$ , rycina 14). Z korelacji wynika, że wysoka aktywność MMP-2 w płytkach krwi wiąże się z niską aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej, co może sugerować pochłanianie zewnątrzkomórkowej proMMP-2 przez płytki krwi. Wymaga to jednak dalszych badań. Nie stwierdzono żadnych zależności pomiędzy aktywnością proMMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi a aktywnością tych MMP w przestrzeni pozakomórkowej zarówno po etapie niedokrwienia, jak i po etapie następowej reperfuzji w grupie badanej. Podobnie aktywność MMP-9 w kardiomiocytach nie była skorelowana z aktywnością tej MMP w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia i po etapie reperfuzji w grupie badanej. Co ważne, wykazano tendencję do umiarkowanej dodatniej korelacji aktywności proMMP-2 w kardiomiocytach z aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia ( $r = 0,3035$ ,  $p = 0,0913$ , rycina 13). Natomiast aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach wykazywała silną ujemną korelację z aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji ( $r = -0,5161$ ,  $p = 0,0049$ , rycina 15).

**Tabela 4. Współczynniki korelacji rang Spearmana (<sup>S</sup>) lub Pearsona (<sup>P</sup>) dla aktywności MMP-2 i MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej.**

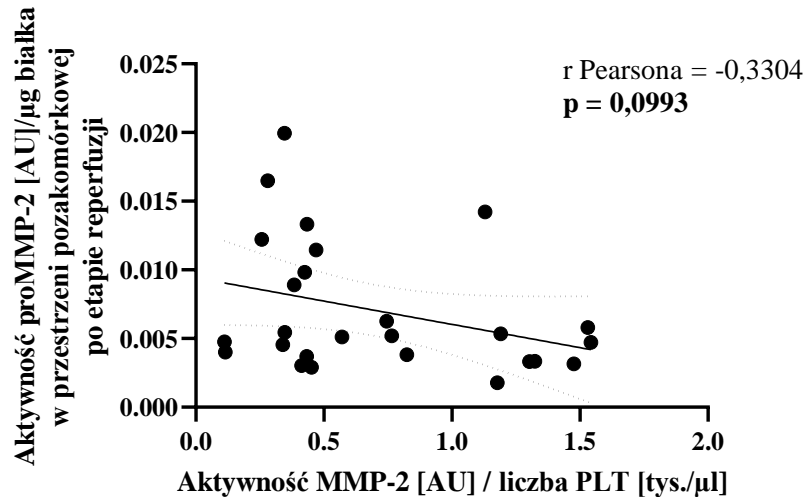
Korelacje		
	Aktywność w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia	
	proMMP-2	MMP-9
Aktywność proMMP-2 w płytkach krwi	r = 0,04556; p = 0,7919 <sup>S</sup>	
Aktywność MMP-2 w płytkach krwi	<b>r = -0,4046; p = 0,0958<sup>P</sup></b>	
Aktywność MMP-9 w płytkach krwi		r = -0,006568; p = 0,9735 <sup>S</sup>
Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach	<b>r = 0,3035; p = 0,0913<sup>S</sup></b>	
Aktywność MMP-2 w kardiomiocytach	r = -0,1730; p = 0,3436 <sup>S</sup>	
Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach		r = -0,1560; p = 0,4280 <sup>S</sup>
	Aktywność w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji	
	proMMP-2	MMP-9
Aktywność proMMP-2 w płytkach krwi	r = 0,08812; p = 0,6557 <sup>S</sup>	
Aktywność MMP-2 w płytkach krwi	<b>r = -0,3304; p = 0,0993<sup>P</sup></b>	
Aktywność MMP-9 w płytkach krwi		r = 0,2335; p = 0,1984 <sup>S</sup>
Aktywność proMMP-2 w kardiomiocytach	<b>r = -0,5161; p = 0,0049<sup>S</sup></b>	
Aktywność MMP-2 w kardiomiocytach	r = 0,2025; p = 0,3014 <sup>S</sup>	
Aktywność MMP-9 w kardiomiocytach		r = -0,2661; p = 0,1410 <sup>S</sup>



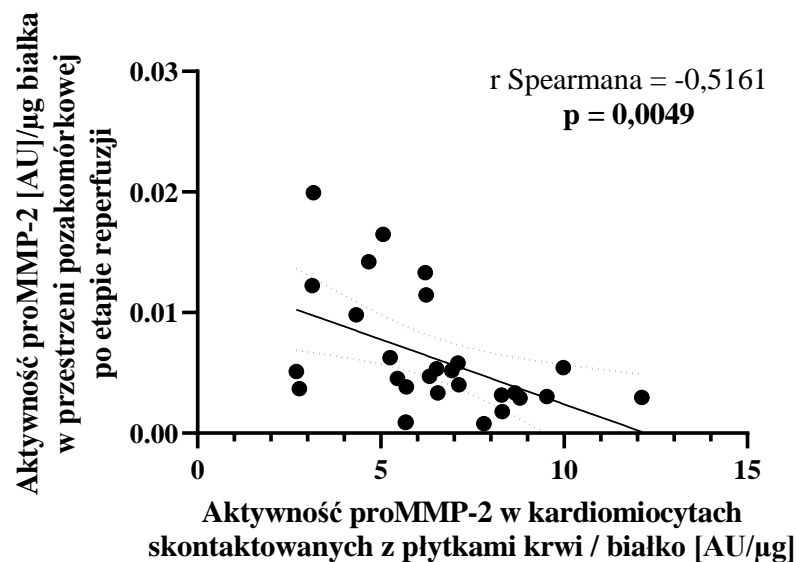
Rycina 12. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia. PLT-płytki krwi.



Rycina 13. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w kardiomiocytach a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).



Rycina 14. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji. PLT-płytki krwi.

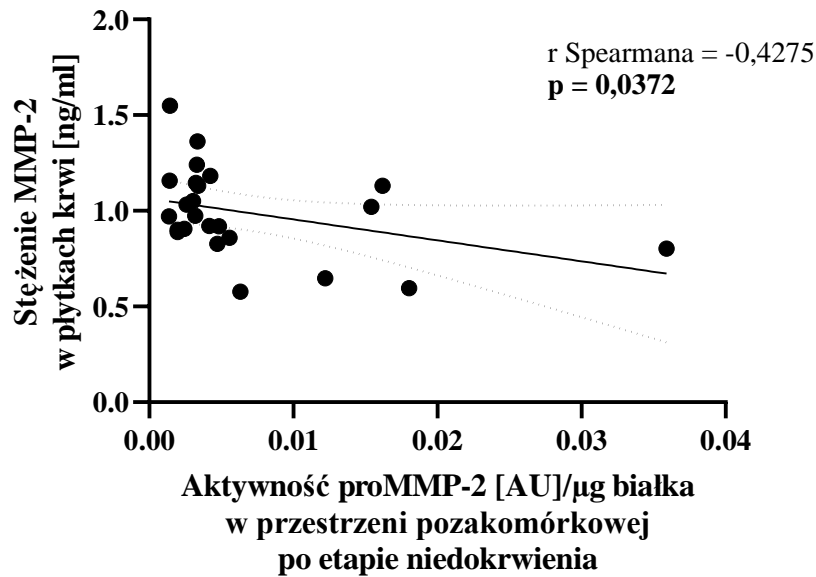


Rycina 15. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w kardiomiocytach a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej (HCM+PLT).

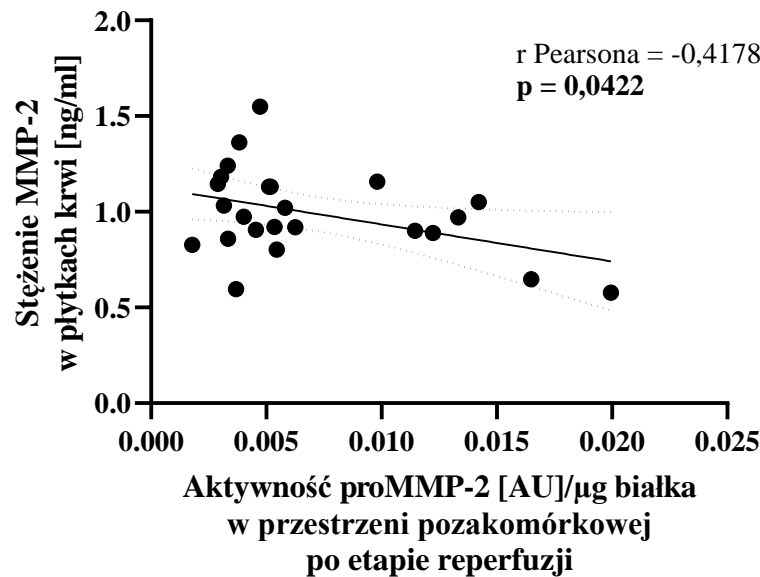
Ponadto stwierdzono umiarkowanie silną ujemną korelację pomiędzy stężeniem MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia ( $r = -0,4436$ ;  $p = 0,0299$ ) i po etapie reperfuzji ( $r = -0,4178$ ,  $p = 0,0422$ ) w grupie badanej, co zaprezentowano na rycinach 16 i 17. Uzyskane zależności mogą stanowić argument do potwierdzenia tezy, iż płytki krwi mogą pochłaniać zewnątrzkomórkową proMMP-2.

Tabela 5. Współczynniki korelacji rang Spearmana (<sup>S</sup>) i Pearsona (<sup>P</sup>) dla stężenia MMP-2 w płytkach krwi i aktywności MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej.

Korelacje	Aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej	
	po etapie niedokrwienia	po etapie reperfuzji
Stężenie MMP-2 w płytkach krwi	$r = -0,4275, p = 0,0372^S$	$r = -0,4178, p = 0,0422^P$



Rycina 16. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia a stężeniem MMP-2 w płytkach krwi.

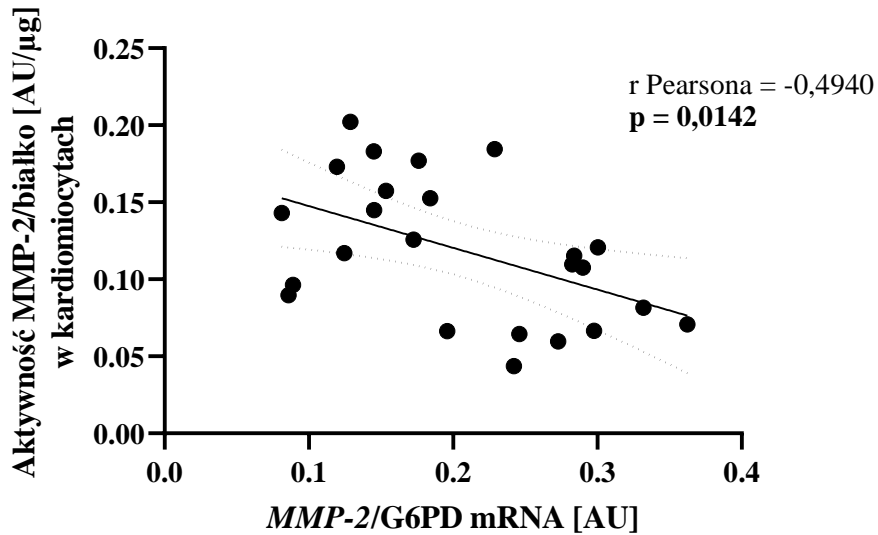


Rycina 17. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji a stężeniem MMP-2 w płytkach krwi.

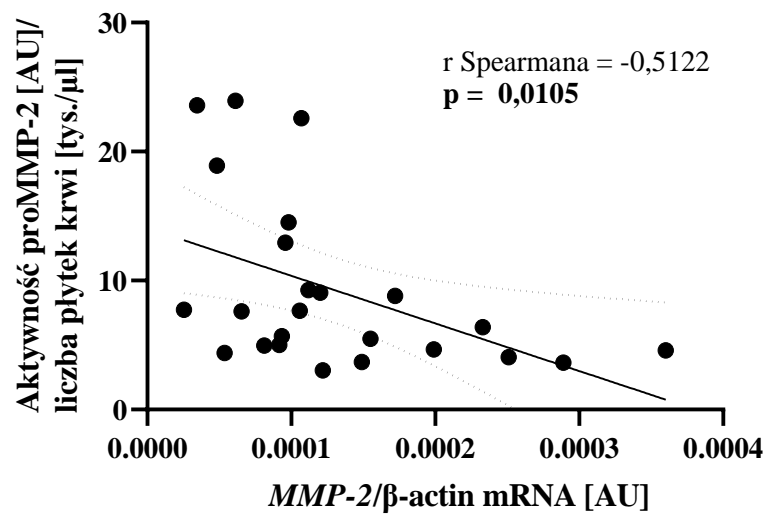
Analiza korelacji ekspresji i aktywności MMP (tabela 6) wykazała umiarkowanie silną ujemną korelację pomiędzy ekspresją *MMP-2* w kardiomiocytach a aktywnością *MMP-2* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej ( $r=-0,4940$ ,  $p=0,0142$ , rycina 18). Dodatkowo wykazano silną ujemną korelację pomiędzy: ekspresją *MMP-2* a aktywnością pro*MMP-2* w płytkach krwi ( $r=-0,5122$ ,  $p=0,0105$ , rycina 19) oraz ekspresją *MMP-9* a aktywnością *MMP-9* w płytkach krwi ( $r=-0,5017$ ,  $p=0,0125$ , rycina 21). Co ważne, wykazano umiarkowanie silną ujemną korelację pomiędzy ekspresją *MMP-2* a aktywnością *MMP-2* w płytkach krwi ( $r=-0,4035$ ,  $p=0,0506$ , rycina 20). Uzyskane ujemne korelacje pomiędzy ekspresją i aktywnością wybranych MMP mogą świadczyć o zahamowaniu translacji białek.

**Tabela 6. Współczynniki korelacji rang Spearmana (<sup>S</sup>) i Pearsona (<sup>P</sup>) dla ekspresji genów *MMP 2* i *MMP-9* oraz aktywności tych MMP-2 w płytkach krwi i kardiomiocytach.**

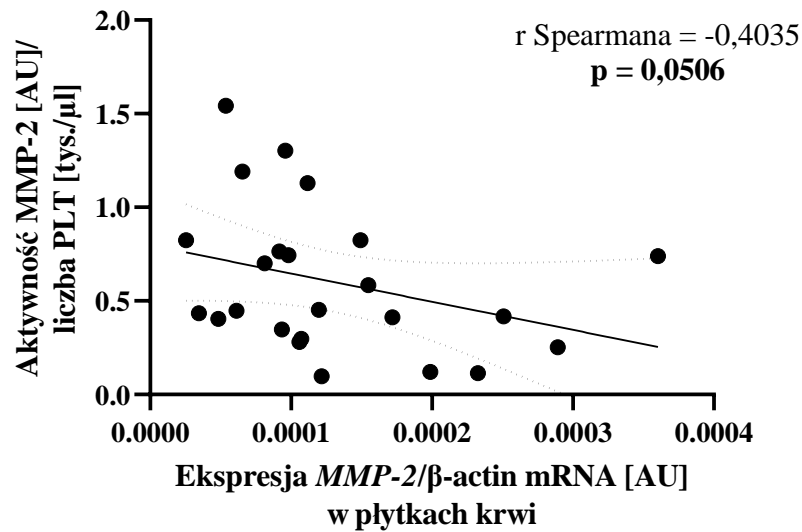
Korelacje		Aktywność pro <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach	Aktywność <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach
Ekspresja <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach	grupa kontrolna (HCM)		
		$r = 0,2096$ $p = 0,3257^S$	$r = -0,4940$ $p = 0,0142^P$
	grupa badana (HCM+PLT)		
		$r = 0,2892$ $p = 0,1704^P$	$r = -0,07383$ $p = 0,7317^P$
	Aktywność pro <i>MMP-2</i> w płytkach krwi	Aktywność <i>MMP-2</i> w płytkach krwi	
Ekspresja <i>MMP-2</i> w płytkach krwi	grupa badana (HCM+PLT)		
		$r = -0,5122$ $p = 0,0105^S$	$r = -0,4035$ $p = 0,0506^S$
	Aktywność <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach		Aktywność <i>MMP-9</i> w płytkach krwi
Ekspresja <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach	grupa kontrolna (HCM)	Ekspresja <i>MMP-9</i> w płytkach krwi	grupa badana (HCM+PLT)
	$r = -0,2470$ $p = 0,2447^S$		
	grupa badana (HCM+PLT)		$r = -0,5017$ $p = 0,0125^S$
	$r = 0,3226$ $p = 0,1242^S$		



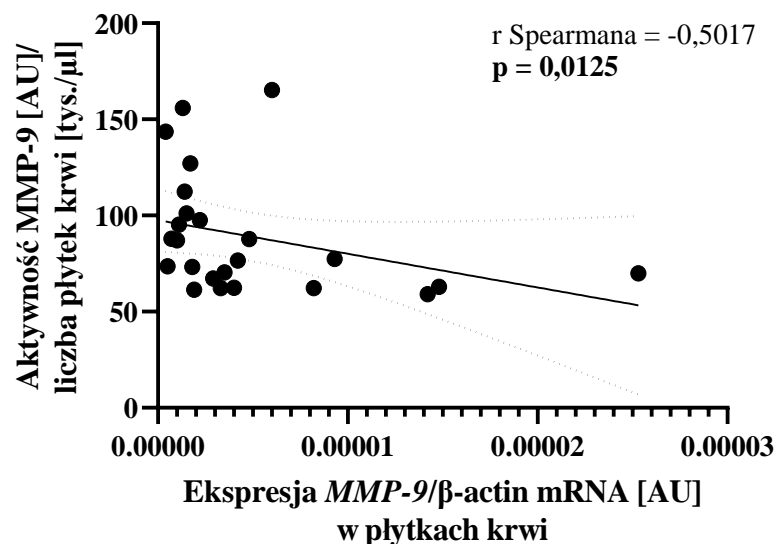
Rycina 18. Diagram korelacji pomiędzy ekspresją genu *MMP-2* w kardiomiocytach a aktywnością MMP-2 oznaczoną w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM). HCM – ludzkie kardiomiocyty.



Rycina 19. Diagram korelacji pomiędzy ekspresją genu *MMP-2* w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w płytkach krwi.



Rycina 20. Diagram korelacji pomiędzy ekspresją genu *MMP-2* w płytkach krwi a aktywnością *MMP-2* w płytkach krwi.



Rycina 21. Diagram korelacji pomiędzy ekspresją *MMP-9* w płytkach krwi a aktywnością *MMP-9* w płytkach krwi.

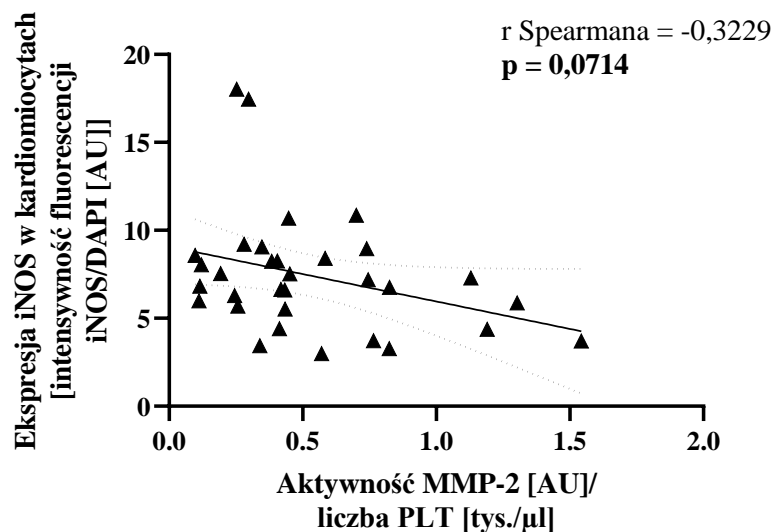
W celu sprawdzenia, czy zmiany w aktywności MMP wywołane przez płytki krwi mogą brać udział w ochronie kardiomiocytów przed uszkodzeniem spowodowanym I/R przeanalizowano zależność pomiędzy aktywnością *MMP-2* i *MMP-9* w płytkach krwi a: ekspresją iNOS w kardiomiocytach, aktywnością zewnątrzkomórkowego LDH oraz aktywnością metaboliczną kardiomiocytów. Wyniki przedstawiono w tabeli 7. W toku przeprowadzonych analiz stwierdzono umiarkowanie silną ujemną tendencję do zależności pomiędzy ekspresją białka iNOS w kardiomiocytach a aktywnością *MMP-2*



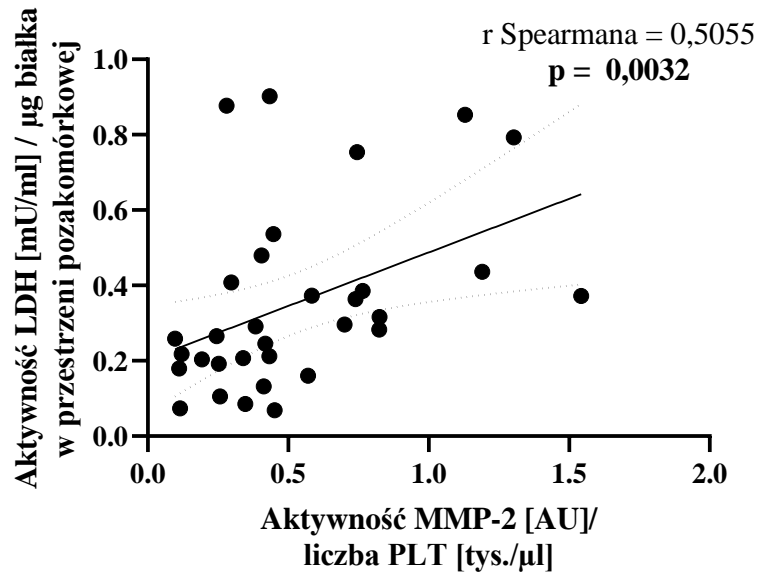
w płytkach krwi ( $r = -0,3229$ ,  $p = 0,0714$ , rycina 22). Dodatkowo wykazano silną dodatnią zależność pomiędzy aktywnością LDH w przestrzeni pozakomórkowej a aktywnością MMP-2 ( $r = 0,5055$ ,  $p = 0,0032$ , rycina 23) i MMP-9 ( $r = 0,5198$ ,  $p = 0,0023$ , rycina 26) w płytkach krwi. Co ważne, aktywność metaboliczna kardiomiocytów wykazywała ujemną korelację z aktywnością MMP-2 ( $r = -0,4846$ ,  $p = 0,0049$ , rycina 24) i MMP-9 ( $r = -0,6089$ ,  $p = 0,0002$ , rycina 25) w płytkach krwi. Nie odnotowano zależności pomiędzy ekspresją iNOS kardiomiocytów a aktywnością MMP-9 w płytkach krwi.

**Tabela 7. Współczynniki korelacji rang Spearmana dla MMP-2, MMP-9 i iNOS, LDH oraz aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie badanej.**

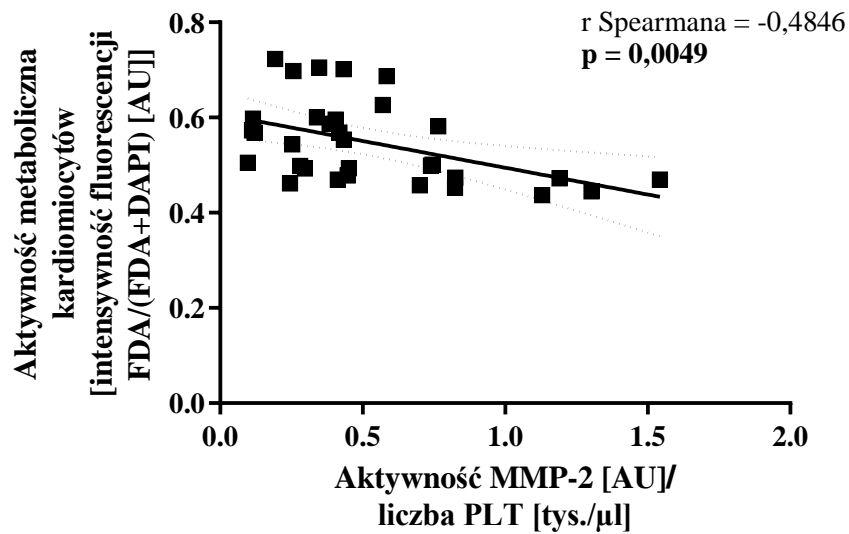
Korelacja	Ekspresja iNOS kardiomiocytów	Aktywność LDH w przestrzeni pozakomórkowej	Aktywność metaboliczna kardiomiocytów
Aktywność MMP-2 w płytkach krwi	$r = -0,3229$ ; $p = 0,0714$	$r = 0,5055$ ; $p = 0,0032$	$r = -0,4846$ ; $p = 0,0049$
Aktywność MMP-9 w płytkach krwi	$r = 0,1411$ ; $p = 0,4410$	$r = 0,5198$ ; $p = 0,0023$	$r = -0,6089$ ; $p = 0,0002$



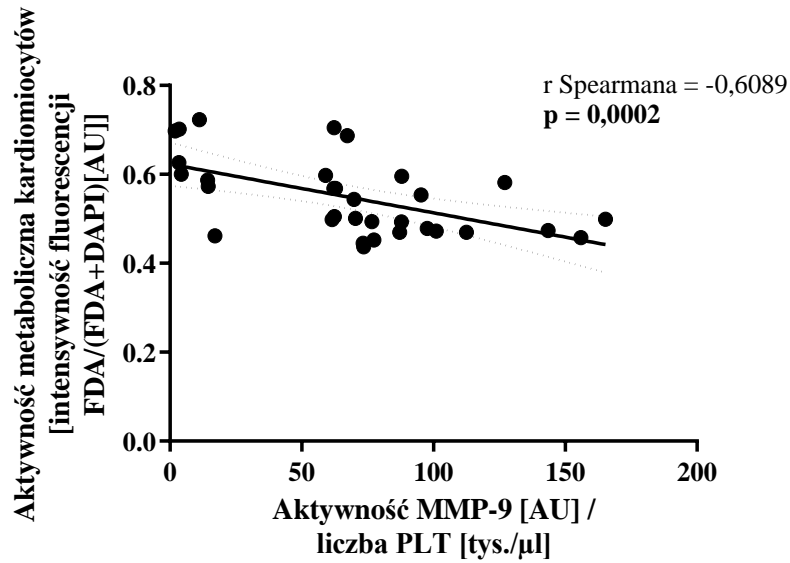
**Rycina 22. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a ekspresją białka iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT). HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.**



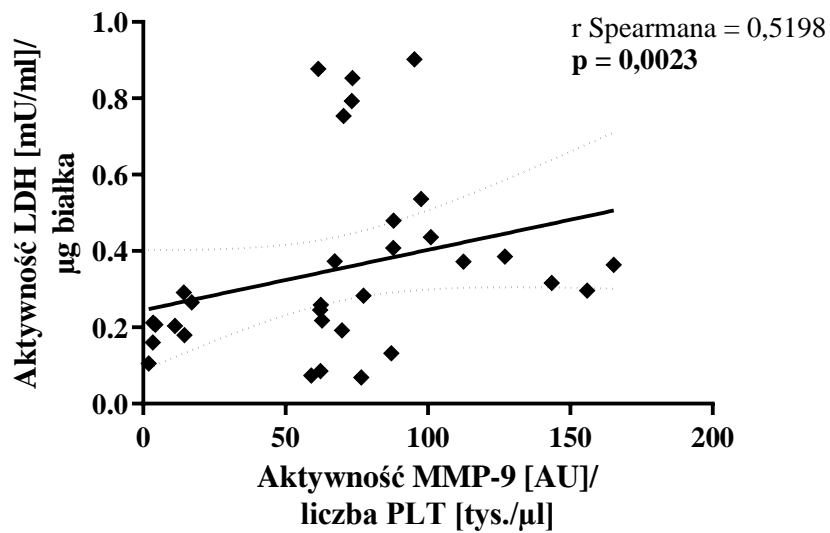
Rycina 23. Diagram korelacji pomiędzy stężeniem MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów. PLT – płytki krwi.



Rycina 24. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów w grupie badanej (HCM+PLT). HCM – ludzkie kardiomiocyty, PLT – płytki krwi.



Rycina 25. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-9 w płytkach krwi a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów.



Rycina 26. Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-9 w płytkach krwi a aktywnością LDH w przestrzeni pozakomórkowej.

## IV. DYSKUSJA

Choroby sercowo-naczyniowe, obok chorób nowotworowych, wciąż stanowią ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Z raportu ESC opublikowanego w 2022 roku wynika, że choroby układu krążenia są najczęstszą przyczyną zgonów w krajach członkowskich ESC, a całkowita liczba zgonów z powodów sercowo-naczyniowych, we wszystkich krajach objętych badaniem, znacznie przewyższa liczbę zgonów z powodu nowotworów u obu płci <sup>222</sup>. W związku z powyższym kluczowe wydaje się dokładne poznanie patofizjologii, mechanizmów oraz nowych możliwości leczniczych, które mogą mieć zastosowanie w przyszłości w leczeniu chorób układu krążenia.

Najczęstszą postacią chorób sercowo-naczyniowych jest MI, a standardowe leczenie opiera się na przywróceniu krążenia w niedokrwionej tkance. Jednak podczas reperfuzji może dojść do IRI mięśnia sercowego <sup>40</sup>. Leczenie przeciwplatekcyjne jest standardowo stosowaną terapią w zapobieganiu oraz leczeniu MI i IRI <sup>223,224</sup>. Choć płytki krwi biorą udział w patomechanizmie MI i IRI, a w literaturze szeroko opisana jest negatywna rola płytek krwi w wymienionych schorzeniach, dostępne są także doniesienia o kardioprotekcyjnym wpływie płytek krwi na mięsień sercowy w przebiegu MI i IRI <sup>97-99,105,225,226</sup>. Dlatego pierwszym celem niniejszej rozprawy było sprawdzenie czy, w warunkach I/R płytki krwi ulegają aktywacji, w wyniku której uwalniają PMP. Kolejnym celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy płytki krwi wpływają na zmianę aktywności MMP-2 oraz MMP-9 oraz ekspresji ich genów w kardiomiocytach. Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie i przybliżenie nas do odpowiedzi na pytanie, czy płytki krwi mogą wywierać efekt ochronny na kardiomiocyty poddane I/R.

### *Aktywacja płytek krwi*

Markery aktywacji płytek krwi badane w niniejszej pracy obejmowały aktywowaną GP IIb-IIIa, P-selektynę oraz CD63. Aktywowana GP IIb-IIIa stanowi receptor dla fibrynogenu i odgrywa rolę w agregacji płytek krwi. W przebiegu aktywacji płytek dochodzi do wzmożonego uwalniania zawartości ziarnistości płytkowych, zwiększa się liczebność kopii kompleksu GP IIb-IIIa na błonie płytek krwi, a w konsekwencji wzrasta ekspresja GP IIb-IIIa <sup>227</sup>. P-selektyna jest członkiem nadrodziny selektyn, białkiem ziarnistości  $\alpha$ , które w wyniku aktywacji płytek ulega ekspresji na ich powierzchni. P-selektyna odgrywa ważną rolę w interakcjach adhezyjnych, głównie między granulocytami a płytkami krwi np. podczas zapalenia <sup>228</sup>. Hamowanie P-selektyny przy

użyciu przeciwciał monoklonalnych po uszkodzeniu ściany tętnicy w modelach zwierzęcych skutkowało znaczącym zmniejszeniem adhezji płytek krwi i neutrofilów, co sugeruje rolę P-selektyny i płytek w szlaku zakrzepowo-zapalnym po pęknięciu blaszki miażdżycowej<sup>229,230</sup>. CD63 należy do nadrodziny integralnych białek błonowych, tetraspanin<sup>231</sup>. W spoczynkowych płytkach krwi białko CD63 jest obecne na błonach ziarnistości gęstych<sup>232</sup> i lizosomów<sup>233</sup>, natomiast w wyniku aktywacji płytek i egzocytozy CD63 przemieszcza się do błony plazmatycznej, gdzie wiąże się z kompleksem integryny  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -CD9 oraz z cytoszkieletem aktynowym, mogąc wpływać na jego reorganizację<sup>234</sup>, w sposób zależny od  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ <sup>235</sup>.

Pierwszym szczegółowym celem niniejszej rozprawy było sprawdzenie czy, w warunkach I/R płytki krwi ulegają aktywacji, co prowadzi do uwolnienia PMP. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki są dowodem na to, że płytki krwi ulegają aktywacji w wyniku 25 minutowego niedokrwienia, o czym świadczy wyższa ekspresja wszystkich badanych markerów aktywacji płytek krwi po 25 minutowym niedokrwieniu w porównaniu do 20 minut niedokrwienia. Natomiast po etapie reperfuzji ekspresja markerów aktywacji była porównywalna z ekspresją w warunkach tlenowych, z wyjątkiem aktywowanej GP IIb-IIIa, której ekspresja dla I/R z 15-minutami niedokrwienia była wyższa niż w grupie kontrolnej. W literaturze przedmiotu można odnaleźć badania potwierdzające aktywację płytek krwi w warunkach I/R. Badania dowodzą, że zastosowanie inhibitorów aktywacji płytek niesie pozytywny wpływ na IRI mięśnia sercowego<sup>62,236</sup>. Itoh i in. wykazali, że u pacjentów z ACS P-selektyna może stanowić marker o wartości predykcyjnej zarówno dla aktywacji płytek krwi, jak i oceny ryzyka ostrych incydentów sercowych<sup>237</sup>. Z kolei Ying i in. w badaniach na szczurach poddanych I/R wykazali, że magnez, podawany podczas I/R, powodował obniżoną ekspresję P-selektyny na powierzchni płytek krwi podczas reperfuzji oraz zmniejszył stopień martwicy mięśnia sercowego<sup>62</sup>. W badaniach na myszach z unieczynnionym genem dla P-selektyny wykazano mniejszy obszar zawału w porównaniu do myszy z nienaruszonym genem<sup>82</sup>. W tych samych badaniach wykazano, że u myszy z nienaruszonym genem dla P-selektyny, krążące płytki krwi ulegają aktywacji na etapie wczesnej reperfuzji, a aktywacja płytek krwi zależy od czasu trwania okluzji wieńcowej poprzedzającej reperfuzję<sup>82</sup>. Akumulacja płytek krwi w miejscu wcześniej niedokrwionego mięśnia sercowego zachodziła bardzo wcześnie, bo już 2 minuty po rozpoczęciu reperfuzji<sup>82</sup>. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy wykazano wzmoczoną aktywację płytek krwi w warunkach I/R, mierzoną jako podwyższoną

ekspresję powierzchniowych markerów aktywacji płytek krwi: aktywowanej GP IIb-IIIa, P-selektyny, CD63 po 25 minutach niedokrwienia. W zastosowanym modelu płytki krwi uległy aktywacji znacznie szybciej niż we wspomnianych wyżej badaniach, bo już po 25 minutach niedokrwienia. Wykazano, że ekspresja markerów aktywacji po etapie reperfuzji nie różniła się w stosunku do właściwej grupy odniesienia. Wyjątek stanowiła ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa, gdyż po 15 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji ekspresja tej GP była wyższa niż w warunkach tlenowych. Rozbieżność w uzyskanym czasie aktywacji płytek krwi w niniejszym badaniu oraz wynikach uzyskanych przez innych badaczy może być spowodowana zastosowaniem innego modelu i schematu badania. Zaprezentowany model był modelem *in vitro*, natomiast przytaczane dane literaturowe są efektem pracy na modelach *in vivo*. Dodatkowo pobieranie płytek krwi do badania ich aktywacji przed i po reperfuzji w niniejszym modelu *in vitro* umożliwiło uzyskanie pełniejszego obrazu aktywacji płytek krwi w trakcie badania, biorąc pod uwagę czas oraz mechanizm aktywacji płytek krwi. Dlatego uzyskane wyniki dopełniają wiedzę na temat aktywacji płytek krwi w mechanizmie niedokrwienia i następczej reperfuzji, co ma istotne znaczenie dla przyszłych implikacji klinicznych.

Wykazano wyższą ekspresję aktywowanej GP IIb-IIIa po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu niedokrwienia, a dla płytek krwi poddanych 20 minutowemu niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji zmiana ta była istotna statystycznie. Porównując ekspresję P-selektyny po etapie niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji uzyskano podobne rezultaty. Wskazuje to na dalszą aktywację płytek, również na etapie reperfuzji. W przypadku markera CD63 także wykazano wyższą ekspresję po etapie reperfuzji w porównaniu do etapu niedokrwienia dla płytek krwi poddanych 20 minutowemu niedotlenieniu i 20 minutowej reperfuzji oraz wzrost ekspresji w czasie badania dla warunków tlenowych. Co ciekawe reperfuzja po 15 i 25 minutowym niedokrwieniu nie wpływała na zwiększoną ekspresję CD63. Biorąc pod uwagę powyższe oraz fakt, iż porównanie ekspresji markerów aktywacji płytek krwi po etapie reperfuzji w grupie I/R w porównaniu do warunków tlenowych nie wykazało zmian ekspresji tych markerów wydają się, że brak dodatkowej aktywacji po etapie reperfuzji może wynikać ze zużycia i wyczerpania zasobów wewnątrzpłytkowych, a ponadto z niskiej liczebności grupy<sup>227</sup>. Ze względu na to, że płytki krwi są komórkami bezjądrzastymi i nie są zdolne do syntezy białek *de novo*, wyczerpanie zasobów wewnątrzpłytkowych skutkuje niemożnością np. uwolnienia zawartości kolejnych ziarnistości i dalszego wzrostu ekspresji białek

ziarnistych np. P-selektyny na powierzchni płytek krwi. Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa potwierdza tę hipotezę, ponieważ tylko w I/R z 15 minutowym niedokrwieniem ekspresja tej GP była wyższa niż w warunkach tlenowych, natomiast dłuższy czas niedokrwienia, a co za tym idzie dłuższy czas badania, skutkowało ekspresją tego markera porównywalną do ekspresji uzyskanej w warunkach tlenowych. Dodatkowo niektóre białka, np. P-selektyna, ulegają ekspresji na błonie komórkowej płytek krwi przejściowo, po czym ulegają złuszczeniu do osocza krwi. W konsekwencji może to wpływać nie tylko na normalizację aktywacji płytek, ale także zmniejszoną ekspresję niektórych markerów aktywacji <sup>227</sup>. Zatem brak dodatkowej aktywacji płytek krwi po etapie reperfuzji w niniejszych badaniach może wynikać nie tylko ze zużycia zasobów płytek krwi, ale i z czasu jaki upłynął od wynaczynienia i wyizolowania płytek krwi do zakończenia całej procedury I/R.

#### *Mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego*

W dotychczas opublikowanych badaniach wykazano zwiększoną liczbę PMP w osoczu w wyniku ACS <sup>131,141,145</sup>. Udowodniono, że liczba PMP uwalnianych przez płytki krwi jest zależna od postaci ACS, np. w niestabilnej dławicy piersiowej jest niższa niż w STEMI, oraz koreluje ze stopniem uszkodzenia mięśnia sercowego <sup>142</sup>. Wykazano, że zwiększona liczba PMP wiąże się ze zwiększonym ryzykiem niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych tj.: zgonu sercowego, niewydolności serca, wstrząsu kardiogenego, ponownego zawału i resuscytowanej komorowej arytmii, do 1 roku po wypisaniu ze szpitala <sup>238</sup>.

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy odszczepianie PMP od płytek krwi oceniono poprzez analizę ekspresji CD61, antygenu charakterystycznego dla płytek krwi, oraz aktywowanej GP IIb-IIIa, stanowiącej receptor dla fibrynogenu, w buforach pozbawionych płytek krwi. Zastosowanie insertów przepuszczalnych dla PMP umożliwiło uzyskanie buforów pozbawionych płytek krwi i zawierających jedynie PMP. Wykazano obniżoną ekspresję obu antygenów w buforach zawierających PMP po niedokrwieniu w porównaniu do kontroli tlenowej, co świadczy o ograniczonej zdolności płytek do odszczepiania PMP w warunkach niedokrwienia. Może to wynikać z zastosowanego modelu badania *in vitro*, który nie zawiera komponenty zapalnej. Niektórzy badacze uważają, że komponenta zapalna, która towarzyszy pacjentom z chorobami sercowo-naczyniowymi, wpływa na zwiększoną aktywację płytek krwi <sup>239,240</sup> oraz uwalnianie i zmianę fenotypu PMP <sup>241</sup>. Dodatkowo Somodi i in.

w swoich badaniach wskazują na ważny aspekt zmian w ekspresji formy komórkowej XIII czynnika krzepnięcia, zarówno na powierzchni płytek krwi, jak i PMP, wynikającej z różnych mechanizmów aktywacji płytek krwi <sup>242</sup>. W związku z powyższym istnieje możliwość, że niedokrwienie z następczą reperfuzją wpłynęło na uwalnianie PMP w przedstawionym modelu. Inni badacze wskazują, że zarówno zawartość PMP, jak i ekspresja markerów powierzchniowych zależą od zastosowanego agonisty płytek krwi, a powstające populacje PMP są wysoce niejednorodne <sup>243,244</sup>. Co ważne, w obecnych badaniach wykazano liniowy wzrost ekspresji CD61 na powierzchni PMP wraz z czasem trwania niedokrwienia. Świadczy to o wpływie warunków I/R na uwalnianie PMP. Jednak izolowane warunki *in vitro* mogły przyczynić się do uzyskania niższej ekspresji w warunkach I/R niż w warunkach tlenowych ze względu na inny mechanizm aktywacji płytek. Podsumowując, zmniejszona ekspresja CD61 oraz aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni PMP może być spowodowana brakiem interakcji płytek krwi z komórkami zapalnymi, co mogło doprowadzić do aktywacji płytek krwi w innym mechanizmie niż w badaniach *in vivo*. Wykazano zarówno właściwości prokoagulacyjne <sup>245-247</sup>, jak i antykoagulacyjne <sup>248,249</sup> PMP. Zastosowanie odmiennych protokołów przygotowania PMP do badania cytometrycznego mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Berckmans i in. wprowadzając dwustopniowe wirowanie w protokole przygotowania PMP dokonali weryfikacji <sup>250</sup> wyników swojej poprzedniej pracy <sup>251</sup>. W porównaniu z wcześniejszym badaniem <sup>251</sup> autorzy podają wyższe stężenia PMP we krwi <sup>252</sup>, które wykazywały aktywność fibrynolityczną w teście wytwarzania plazminy <sup>252</sup>. W poprzedniej pracy PMP wykazywały aktywność prokoagulacyjną w teście wytwarzania trombiny <sup>251</sup>, co mogło być spowodowane obecnością płytek krwi w badanym materiale. W zaprezentowanym modelu badania ekspresja receptora dla fibrynogenu była niższa w warunkach I/R niż w warunkach tlenowych, co może świadczyć o tym, że kardiomiocyty wpływają na zmniejszenie zdolności prokoagulacyjnych PMP. Niemniej jednak konieczne byłoby zbadanie, metodą cytometrii przepływową, innych antygenów na PMP, które mogłyby potwierdzić wpływ kardiomiocytów na płytki krwi. Może przyczynić się to w przyszłości do oceny mechanizmu wzajemnego oddziaływania PMP i kardiomiocytów.

Kolejnym aspektem wymagającym omówienia w tej części pracy jest kwestia kontroli izotypowej w badaniach PMP. W badaniach metodą cytometrii przepływową stosuje się kontrolę izotypową, w celu oceny nieswoistego wiązania przeciwciał. Jednak badanie PMP przy użyciu cytometrii przepływową często następuje wielu trudności, ze względu na niską intensywność barwienia antygenów powierzchniowych, a niespecyficzne



wiązanie kontroli izotypowych może doprowadzić do uzyskania błędnych wyników<sup>253</sup>. Dlatego w niniejszym badaniu, ze względu na możliwość niespecyficznego wiązania kontroli izotypowych oraz fakt, że uzyskane wyniki służą do porównania PMP pomiędzy grupami badanymi zrezygnowano z zastosowania kontroli izotypowej, a do ustalenia granicy odcięcia posłużono się materiałem niebarwionym<sup>253–255</sup>.

### *Żelatynazy*

Znany jest udział żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) w degradacji wewnątrzkomórkowych białek kurczliwych, takich jak troponiny, łańcuchy lekkie miozyny i tytyna oraz w uszkodzeniu mięśnia sercowego podczas niedokrwienia i reperfuzji<sup>190,191,199,200</sup>. MMP, syntetyzowane jako pre-proenzymy oraz wydzielane z komórek w postaci proenzymów, ulegają aktywacji m.in. w macierzy zewnątrzkomórkowej<sup>256</sup>. W stanie stresu oksydacyjnego, ROS i ONOO<sup>-</sup> mogą oddziaływać z cysteiną w przełączniku cysteinowym i aktywować proMMP bez proteolitycznego usuwania domeny propeptydowej<sup>257–259</sup>. Zatem stres oksydacyjny indukuje aktywację MMP i pośredniczy w wewnątrzkomórkowej degradacji białek kurczliwych, uszkodzeniu mikrokrażenia lub uszkodzeniu mięśnia sercowego<sup>190,191,257</sup>. Drugi cel szczegółowy niniejszej pracy stanowiła analiza zmiany aktywności MMP-2 i MMP-9 w kardiomiocytach i płytkach krwi po I/R oraz w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia i po etapie reperfuzji, wraz z oceną ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* w płytkach krwi i kardiomiocytach po I/R.

### *MMP-2*

W niniejszych badaniach wykazano obniżoną aktywność proMMP-2, a także spadek średniej aktywności MMP-2 o 36,36% – 45,65% w kardiomiocytach poddanych I/R i nieskontaktowanych z płytkami krwi. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o zaburzeniach aktywności MMP-2 w kardiomiocytach narażonych na stres oksydacyjny. Podobnie w przestrzeni pozakomórkowej wykazano obniżoną aktywność proMMP-2 po niedokrwieniu oraz bardzo silną tendencję do obniżonej aktywności proMMP-2 po reperfuzji w porównaniu do warunków tlenowych. Jednak aktywność zewnątrzkomórkowej proMMP-2 po etapie reperfuzji była wyższa niż po etapie niedokrwienia, co sugeruje uszkodzenie kardiomiocytów w wyniku I/R i dalsze uwalnianie proMMP-2 na etapie reperfuzji. Uzyskane wyniki są częściowo spójne z wynikami uzyskanymi w naszej poprzedniej pracy<sup>260</sup> oraz w pracy Olejnik i in., gdzie

w I/R, w wyniku uszkodzenia kardiomiocytów, wykazano obniżone stężenie MMP-2 w kardiomiocytach oraz zwiększoną aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej<sup>261</sup>. Prawdopodobne jest, że w wyniku nekrozy komórek spowodowanej I/R dochodzi do zniszczenia struktur błoniastych, w tym wzrostu przepuszczalności błony komórkowej i uwolnienia zawartości komórek<sup>262</sup>. Wykazano także zwiększoną ekspresję genu *MMP-2* kardiomiocytów po I/R w porównaniu do warunków tlenowych. Uzyskane wyniki sugerują dysproporcję pomiędzy transkrypcją genu a aktywnością MMP w komórce. Ewidentnie podczas I/R zachodzą procesy regulujące, prowadzące do zahamowania aktywności białka pomimo wzmożonej ekspresji genu, które mogą stanowić mechanizm adaptacyjny komórek w warunkach stresu oksydacyjnego. Podobne wyniki w swojej pracy uzyskali Krzywonos-Zawadzka i in.<sup>263</sup> poddając kardiomiocyty 9 minutowemu niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji. U pacjentów z ACS także wykazano zwiększoną ekspresję *MMP-2* i *MMP-9*<sup>264</sup>. Inne badania wykazują obniżoną ekspresję genu *MMP-2* w kardiomiocytach w wyniku I/R z 15 minutową hipoksją oraz 20 minutową reperfuzją<sup>260,261</sup>. Ben-Yosef i in. wykazali obniżoną ekspresję mRNA *MMP-2* w hipoksji trwającej 6 godzin, natomiast przedłużona hipoksja 24 – godzinna powodowała wzrost ekspresji tego genu. Reperfuzja po 6 godzinnej hipoksji powodowała wzrost ekspresji genu *MMP-2* do poziomu ekspresji w warunkach tlenowych. Natomiast reperfuzja po 24 godzinnej hipoksji powodowała dalszą zwiększoną ekspresję w porównaniu do warunków tlenowych<sup>265</sup>. Z powyższego wynika, iż czas trwania niedokrwienia i reperfuzji istotnie wpływa na zmiany ekspresji genów *MMP* w kardiomiocytach. Ponadto z naszych badań wynika, że I/R wpływa na MMP-2 na poziomie transkrypcyjnym, powodując zwiększoną ekspresję genu *MMP-2* kardiomiocytów w grupie kontrolnej. Dodatkowo w niniejszej pracy wykazano umiarkowanie silną ujemną korelację pomiędzy aktywnością MMP-2 a ekspresją jej genu w homogenatach kardiomiocytów. Możliwe jest, że w wyniku I/R i spadku ATP nie doszło do syntezy MMP-2 pomimo zwiększonej ekspresji genu dla *MMP-2*. Jednym z mechanizmów oszczędzania energii, będących wynikiem adaptacji komórek na niedokrwienie, jest inhibicja translacji mRNA na różnych jej etapach jako procesu wysoce energetycznego<sup>266,267</sup>. Istnieje też możliwość, że kardiomiocyty uwolniły proMMP-2 oraz MMP-2 do przestrzeni pozakomórkowej, jednak w wyniku krótkiego czasu półtrwania lub izolowanych warunków *in vitro* nie byliśmy w stanie wykryć jej aktywności w przestrzeni pozakomórkowej<sup>265</sup>.

W grupie badanej, w której kardiomiocyty miały kontakt z płytkami krwi, nie wykazano zmian ekspresji oraz aktywności zarówno proMMP-2, jak i MMP-2 w kardiomiocytach pod wpływem niedokrwienia, jak i reperfuzji w porównaniu do grupy tlenowej. Ponadto, podobnie jak w grupie kontrolnej, wykazaliśmy obniżoną aktywność proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po niedokrwieniu, natomiast aktywność proMMP-2 po etapie reperfuzji nie uległa zmianie. Dowodzi to, iż warunki niedokrwienia, jak i reperfuzji nie wpływają istotnie na zmiany ekspresji, syntezy i uwalniania MMP-2 w obecności płytek krwi. Może to potwierdzać hipotezę, iż interakcja kardiomiocytów i płytek krwi prowadzi do normalizacji syntezy MMP. Co ciekawe, aktywność zewnątrzkomórkowej proMMP-2 po etapie reperfuzji była wyższa niż po etapie niedokrwienia. Podobnie jak w przypadku grupy kontrolnej, może to sugerować uszkodzenie kardiomiocytów w wyniku I/R i dalsze uwalnianie proMMP-2 na etapie reperfuzji. Porównanie wyników grupy kontrolnej z grupą badaną wykazało tendencję do zwiększonej aktywności proMMP-2 w kardiomiocytach w obecności płytek krwi po 20 minutach niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji oraz po 25 minutach niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji, a także zwiększonej aktywności MMP-2 po 20 minutach niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji. Co ważne, porównanie aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej i grupie kontrolnej wykazało obniżoną aktywność proMMP-2 pod wpływem płytek krwi po etapie reperfuzji zarówno w warunkach tlenowych, jak i I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją, a także tendencję do obniżonej aktywności proMMP-2 po 25 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji. Sugeruje to możliwość pochłaniania pozakomórkowej proMMP-2 przez płytki krwi, a przez to działanie kardioprotekcyjne płytek. Natomiast badanie homogenatów płytek krwi wykazało zwiększoną aktywność proMMP-2 w warunkach I/R z 25 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją, zwiększoną aktywność MMP-2 w warunkach I/R z 20 minutowym niedokrwieniem i 20 minutową reperfuzją oraz wyższe stężenie całkowitego MMP-2 po I/R w porównaniu do warunków tlenowych średnio o 28,99% do 38,91%. Dodatkowo nie zaobserwowano zmian w ekspresji mRNA *MMP-2* w płytkach krwi po I/R w porównaniu do warunków tlenowych. Może to świadczyć o tym, że płytki krwi wpływają na zmniejszone uwalnianie MMP-2 z kardiomiocytów po I/R z 20 minutami niedokrwienia i 20 minutową reperfuzją oraz 25 minutami niedokrwienia i 20-minutową reperfuzją. Dodatkowo płytki krwi wpływały na kardiomiocyty na poziomie molekularnym, ponieważ w obecności płytek krwi odnotowano niższą ekspresję genu

*MMP-2* kardiomiocytów po I/R z 15 minutami niedokrwienia i 20 minutową reperfuzją oraz 20 minutami niedokrwienia i 20 minutową reperfuzją w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponieważ znany jest udział *MMP-2* w degradacji białek kurczliwych serca, uzyskane wyniki mogą sugerować ochronny wpływ płytek na kardiomiocyty. Co więcej, wykazano także dodatnią korelację pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a ekspresją genu *MMP-2* w kardiomiocytach grupy badanej. Potwierdza to rolę PMP jako cząsteczek sygnałowych w I/R. Odnotowano także silną ujemną korelację ekspresji *MMP-2* w płytkach krwi z aktywnością pro*MMP-2* w płytkach krwi. Jest prawdopodobne, że analogicznie jak w przypadku kardiomiocytów, w wyniku niedokrwienia mogło dojść do zahamowania translacji mRNA w mechanizmie oszczędzania energii wywołanym niedokrwieniem<sup>266,267</sup>. Literatura przedmiotu wskazuje na możliwość pochłaniania przez płytki krwi np. *MMP-9*, nowotworowego RNA oraz patogenów<sup>173,268–270</sup>. W związku z powyższym prawdopodobne jest, że przy przedłużającym się I/R (25 minutowe niedokrwienie i 20 minutowa reperfuzja) płytki krwi mogły pochłaniać pro*MMP-2* uwolnioną z kardiomiocytów, o czym może świadczyć obniżona aktywność pro*MMP-2* w przestrzeni pozakomórkowej oraz wzrost aktywności tego białka w płytkach krwi, a także ujemna korelacja pomiędzy aktywnością pro*MMP-2* w kardiomiocytach a zewnątrzkomórkową aktywnością tej *MMP*. Uzyskana korelacja wskazuje, że niska aktywność pro*MMP-2* w kardiomiocytach związana jest z wysoką aktywnością zewnątrzkomórkowej pro*MMP-2*, co może sugerować jej uwalnianie z kardiomiocytów do przestrzeni pozakomórkowej.

Ponieważ znany jest udział *MMP-2* w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym kardiomiocytów, uzyskane wyniki mogą świadczyć o ochronnym wpływie płytek krwi na kardiomiocyty poddane I/R<sup>199,200,261</sup>. Gresele i in. badając pacjentów z ACS i stabilną dławicą piersiową w porównaniu do kontroli (pacjentów z atypowym bólem w klatce piersiowej, z normalnymi gładkimi tętnicami wieńcowymi bez zwężeń > 30%) zauważyli jednak wyższe stężenie i aktywność *MMP-2* w osoczu pacjentów z ACS. Dodatkowo w lewej tętnicy wieńcowej stężenie i aktywność *MMP-2* były wyższe w porównaniu do prawej tętnicy wieńcowej, a stężenie *MMP-2* w osoczu pacjentów z ACS korelowało z markerami aktywacji płytek krwi, co według autorów sugeruje, że płytki krwi są źródłem *MMP-2* w ACS<sup>178</sup>. W innych badaniach, na tym samym modelu, wywołanie chemicznego I/R nie wpływało na zmiany w aktywności i stężenia *MMP-2* w płytkach krwi<sup>271</sup>. W niniejszej pracy wykazaliśmy ujemną korelację pomiędzy stężeniem *MMP-2* w płytkach krwi a aktywnością pro*MMP-2* w przestrzeni pozakomórkowej po etapie

niedokrwienia oraz po etapie reperfuzji. Dlatego zwiększona aktywność MMP-2 w płytkach krwi po I/R może stanowić pośredni dowód na pochłanianie przez płytki krwi proMMP-2 uwolnionej z kardiomiocytów, co wymaga potwierdzenia w rozszerzonych badaniach.

### *MMP-9*

MMP-9 jest wydzielana przez różne typy komórek, włączając: neutrofile, makrofagi, komórki śródbłonna i komórki mięśni gładkich. Wykazano znacząco podwyższone stężenie MMP-9 w osoczu pacjentów z ACS <sup>272,273</sup>. W niniejszej pracy nie wykazano zmian w ekspresji genu, jak i aktywności MMP-9 w kardiomiocytach nieskontaktowanych z płytkami krwi, poddanych I/R. Jednak fakt, że aktywność MMP-9 kardiomiocytów po I/R była widocznie niższa niż w warunkach tlenowych, natomiast aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej wzrastała wraz z czasem niedokrwienia kardiomiocytów, może sugerować uwalnianie MMP-9 z kardiomiocytów w wyniku uszkodzenia podczas I/R. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy są częściowo zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy, gdzie wykazano obniżoną ekspresję genu *MMP-9* oraz wyższą ekspresję białka MMP-9 w kardiomiocytach poddanych I/R <sup>261</sup>.

W eksperymencie, w którym skontaktowano kardiomiocyty z płytkami krwi w warunkach I/R, zauważono wzrost aktywności MMP-9 kardiomiocytów wraz z czasem trwania niedokrwienia. Aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej po etapie niedokrwienia nie uległa zmianom, natomiast po etapie reperfuzji zaobserwowano silną tendencję do zwiększonej aktywności w porównaniu do warunków tlenowych. Sugeruje to uwalnianie MMP-9 z kardiomiocytów do przestrzeni pozakomórkowej. Co ważne, po etapie niedokrwienia, wykazano obniżoną aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w obecności płytek krwi. Zważywszy na fakt, iż obecność MMP-9 w płytkach krwi pozostaje kwestią dyskusyjną <sup>173,181,274</sup> oraz że obecność MMP-9 w płytkach prawdopodobnie wynika z pochłaniania MMP-9 uwolnionej przez inne komórki <sup>173</sup>, prawdopodobne jest, że MMP-9 z przestrzeni pozakomórkowej została częściowo zaadsorbowana przez płytki krwi. Potwierdza to fakt nieznacznego zwiększenia aktywności MMP-9 w płytkach krwi po I/R w porównaniu do warunków tlenowych. Odwrotne wyniki w swojej pracy uzyskali Cameron i in. wskazując zmniejszenie zawartości MMP-9 w płytkach krwi myszy po 3 dniach od zawału serca wywołanego podwiązaniem tętnic, co według autorów dowodzi, że płytki krwi

uwalniają MMP-9 po zawale <sup>275</sup>. Jest to szczególnie ważne w kontekście rozważania wzrostu stężenia MMP-9 w osoczu jako markera w diagnostyce rozwoju niewydolności serca u pacjentów po AMI <sup>276</sup>. Rozbieżność w uzyskanych i przytoczonych wynikach badań może być spowodowana obecnością innych komórek, poza kardiomiocytami, które miały kontakt z płytkami krwi. W prezentowanym w niniejszej pracy badaniu, płytki krwi przed kontaktem z kardiomiocytami i poddaniem procedurze I/R, zostały wyizolowane z krwi pełnej metodą pozwalającą uzyskać płytki krwi pozbawione zanieczyszczeń komórkowych. Natomiast w innych badaniach płytki krwi zostały wyizolowane z krwi pełnej dopiero po procedurze I/R, co oznacza, że w trakcie I/R płytki krwi miały kontakt m.in. z neutrofilami, będącymi pierwszym źródłem MMP-9 w obszarach objętych zawałem <sup>277</sup>.

Niektórzy badacze uważają, że chociaż płytki krwi nie posiadają jądra komórkowego, z racji składników pochodzenia megakariocytalnego są zdolne do przetworzenia pre-miRNA w dojrzałe RNA, translacji mRNA oraz potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów <sup>278</sup>. Analiza ekspresji *MMP-9* w kardiomiocytach w grupie kontrolnej i grupie badanej nie wykazała zmian ekspresji *MMP-9* pod wpływem I/R. Porównanie grupy kontrolnej z badaną nie wykazało także zmian ekspresji *MMP-9* kardiomiocytów pod wpływem obecności płytek krwi. Jedynie badanie PCR płytek krwi wykazało tendencję do zwiększonej ekspresji *MMP-9* płytek krwi po 15 minutowym niedotlenieniu i 20 minutowej reperfuzji oraz 20 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji. Niemniej jednak po 25 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji wykazano obniżoną ekspresję *MMP-9* w płytkach krwi w porównaniu do ekspresji po 20 minutowym niedokrwieniu i 20 minutowej reperfuzji. Możliwe jest, że skoro płytki krwi mają zdolność do sekwestracji RNA <sup>269,277</sup> mogły pochłaniać dostępne w buforze RNA uwolnione z kardiomiocytów. Potwierdzenie dla tej tezy może stanowić ujemna korelacja pomiędzy ekspresją genu i aktywnością MMP-9 w płytkach krwi, która wskazuje na zahamowanie translacji MMP-9 w płytkach.

#### *Wpływ płytek krwi na kardiomiocyty*

Rozpatrując wpływ I/R na kardiomiocyty oraz wpływ płytek krwi na kardiomiocyty w warunkach I/R oznaczono aktywność LDH, aktywność metaboliczną kardiomiocytów, ekspresję białka iNOS w kardiomiocytach oraz stężenie białka całkowitego w homogenatach komórek. LDH jest stabilnym enzymem cytozolowym, uwalnianym

w wyniku uszkodzenia czy wzmożonej przepuszczalności błony lub lizy komórek <sup>279</sup>. W wielu pracach wykazano wzrost aktywności LDH w przestrzeni pozakomórkowej w wyniku I/R, jako markera uszkodzenia kardiomiocytów, oraz normalizację tego parametru po zastosowaniu substancji o działaniu kardioprotekcyjnym <sup>260,261,280</sup>. W niniejszej pracy nie wykazano zwiększonej aktywności LDH w przestrzeni pozakomórkowej po niedokrwieniu kardiomiocytów zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej. Wykazano jednak tendencję do wyższego stężenia białka całkowitego w kardiomiocytach po I/R, co może świadczyć o wzmożonej syntezie białek w komórce w wyniku stresu oksydacyjnego m.in. cytokin, MMP. Dowodzi to, iż 15–25 minutowe niedokrwienie i 20 minutowa reperfuzja nie przyczyniły się do uszkodzenia lub wzmożonej przepuszczalności błon kardiomiocytów. Co ciekawe, aktywność MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi była dodatnio skorelowana z aktywnością zewnątrzkomórkowego LDH w przestrzeni pozakomórkowej. Możliwe jest, że proteolityczna degradacja i uszkodzenie na skutek aktywacji MMP prowadzi do uwolnienia LDH z komórki. Biały i in. także nie wykazali zwiększonej aktywności LDH kardiomiocytów po I/R, przy zastosowaniu kardiomiocytów hodowlanych i wywołaniu I/R przy użyciu cyjanku sodu i 2-deoksyglukozy <sup>281</sup>. Kardiomiocyty zawierają ogromną liczbę mitochondriów, które stanowią główne źródło komórkowych ROS <sup>282</sup>. Klimova i Chandel wykazali, że mitochondrialne ROS są niezbędne do stabilizacji czynników transkrypcyjnych indukowanych hipoksją (HIF), które umożliwiają regulację transkrypcji genów zaangażowanych w adaptację komórek do warunków niedotlenienia oraz przeżycie komórek <sup>283</sup>. Zatem odporność kardiomiocytów na uszkodzenie może wynikać z udziału mitochondriów w aktywacji HIF. Porównanie niniejszych wyników uzyskanych w grupie kontrolnej z grupą badaną wykazało wyższą aktywność LDH w grupie badanej po 20 minutach niedokrwienia oraz tendencję do wyższej aktywności LDH w grupie badanej zarówno w warunkach tlenowych (40 minut), jak i w warunkach niedokrwienia trwającego 25 minut. Potwierdza to wcześniejsze doniesienia, iż płytki krwi zawierają LDH i w wyniku dezintegracji są zdolne do jej uwolnienia wraz z zawartością cytozolu <sup>284,285</sup>. Dlatego płytki krwi mogły być źródłem dehydrogenazy w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wraz z wydłużeniem czasu trwania niedokrwienia wykazano spadek aktywności metabolicznej kardiomiocytów nieskontaktowanych z płytkami krwi w porównaniu do kontroli tlenowej, co pośrednio może być związane ze wzrostem śmiertelności kardiomiocytów oraz zahamowaniem procesów metabolicznych w warunkach

anaerobowych. W grupie badanej wykazano obniżenie aktywności metabolicznej kardiomiocytów jedynie w warunkach 20 minutowego niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji. Natomiast analiza wpływu płytek krwi na kardiomiocyty wykazała, że po 25 minutach niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji w obecności płytek krwi zaobserwowano wyższą aktywność metaboliczną kardiomiocytów niż przy braku płytek krwi. Potwierdza to ochronną rolę płytek krwi. Dodatkowo w niniejszej pracy aktywność MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi była ujemnie skorelowana z aktywnością metaboliczną kardiomiocytów. Wszystkie powyższe wyniki sugerują, że płytki krwi mogą pełnić rolę protekcyjną dla metabolizmu kardiomiocytów w I/R. Yang i in. oraz Mehta i in. poddając serca szczurze perfuzji płytkami krwi lub supernatantem otrzymanym po agregacji płytek krwi, także wykazali kardioprotekcyjną rolę płytek krwi w I/R, manifestującą się m.in. wzrostem siły skurczu serca, obniżeniem wartości ciśnienia perfuzji wieńcowej, zmniejszonym uwalnianiem kinazy kreatynowej<sup>97,98,105,225</sup>. Co ważne ochronna rola płytek krwi na miokardium w warunkach I/R była zauważalna niezależnie od czasu trwania I/R oraz przy wartościach liczby płytek krwi znacznie niższych niż fizjologiczne dla szczurów<sup>97,225</sup>. Ponadto Walsh i in. potwierdzili protekcyjny wpływ płytek krwi na żywotność kardiomiocytów narażonych na I/R, wyrażoną jako opóźnienie tempa śmierci kardiomiocytów oraz wskazali aktywację PKC kardiomiocytów jako możliwy mechanizm działania protekcyjnego płytek krwi<sup>101</sup>. Ponadto w niniejszych badaniach wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów, dlatego nie można wykluczyć udziału PMP w działaniu ochronnym płytek krwi podczas I/R. Jednakże zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Nie zauważono zmian w ekspresji iNOS kardiomiocytów w zależności od czasu trwania niedokrwienia zarówno w grupie badanej jak i grupie kontrolnej. Obok neuronalnego NOS (nNOS) oraz eNOS, iNOS katalizuje syntezę endogennego tlenku azotu (NO)<sup>286</sup>. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego I/R dochodzi do zwiększonej ekspresji iNOS kardiomiocytów, a w konsekwencji zwiększonej syntezy tlenku azotu (NO). Jednak w obecności wzmożonej ilości ROS w przebiegu wybuchu tlenowego NO reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym ( $O_2^{\cdot-}$ ) tworząc ONOO<sup>-</sup>, który m.in. aktywuje MMP-2<sup>287</sup>. Wykazano, że zastosowanie inhibitorów NOS oraz inhibitorów MMP-2 prowadzi do kardioprotekcji<sup>287</sup>. W warunkach tlenowych obecność płytek krwi wpływa na zwiększenie ekspresji iNOS w kardiomiocytach. W warunkach dostępności tlenu iNOS indukuje syntezę biodostępnego NO działającego



wazodilatacyjne, hamuje apoptozę, chroni komórki, indukuje proliferację<sup>288</sup>. W niniejszych badaniach obecność płytek krwi w warunkach 25 minutowego niedokrwienia i 20 minutowej reperfuzji spowodowała obniżoną ekspresję iNOS w kardiomiocytach, co mogło przyczynić się do protekcji kardiomiocytów w warunkach I/R m.in. przez obniżoną syntezę NO oraz nadtlenoazotynu. Warto zaznaczyć, że ekspresja iNOS w kardiomiocytach była ujemnie skorelowana z aktywnością MMP-2 w płytkach krwi, co może sugerować udział MMP-2 w działaniu kardioprotekcyjnym płytek. Uzyskane wyniki pokazują, że niska ekspresja iNOS może być związana z wyższą aktywnością MMP-2 w płytkach krwi, co z kolei może być efektem pochłonięcia zewnątrzkomórkowej proMMP-2 przez płytki, co może prowadzić do ochrony kardiomiocytów przed I/R. Dotychczas kardioprotekcyjny wpływ płytek krwi w mechanizmie produkcji NO został opisany dla S1P i niskich stężeń PAF uwalnianych z płytek krwi. S1P wiążąc się z receptorami kardiomiocytów aktywuje szlaki RISK i SAFE prowadząc do kardioprotekcji<sup>289</sup>. Niskie stężenia PAF biorą udział w aktywacji szlaku RISK, przy udziale PKC/Akt/eNOS wywołując działanie kardioprotekcyjne<sup>124</sup>. Postuluje się, że działanie kardioprotekcyjne PAF zależy także od S-nitrozylacji białek biorących udział w transporcie wapnia, takich jak kanały Ca<sup>2+</sup> typu L, za pośrednictwem NO, zmniejszając w ten sposób przeciążenie Ca<sup>2+</sup> podczas niedokrwienia i reperfuzji mięśnia sercowego<sup>290</sup>. Odmienna sytuacja ma miejsce w warunkach tlenowych, gdzie nie dochodzi do wybuchu tlenowego i produkcji ROS. Zaobserwowano, iż pośrednia interakcja kardiomiocytów i płytek krwi w warunkach tlenowych spowodowała wyższą ekspresję iNOS kardiomiocytów. W warunkach fizjologicznych biodostępny NO zmniejsza agregację płytek krwi, hamuje adhezję leukocytów do ściany naczynia, ogranicza syntezę i działanie czynników prozapalnych, a przez aktywację rozpuszczalnej guanylocyklazy i wzrostu cyklicznego guanozyno monofosforanu (ang. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP), moduluje relaksację mięśni gładkich, co przyczynia się do rozszerzenia naczyń krwionośnych i w konsekwencji poprawy perfuzji serca. NO w zdrowym mięśniu sercowym, przez aktywację różnych szlaków metabolicznych, prowadzi do zmniejszonej wrażliwości mięśnia sercowego na Ca<sup>2+</sup>, zmniejszonego zużycia O<sub>2</sub> w mitochondriach, zmniejszonego stężenia Ca<sup>2+</sup> w cytozolu<sup>288</sup>. W niniejszych badaniach interakcja płytek krwi z kardiomiocytami i poddanie ich 25 minutowemu niedokrwieniu oraz 20 minutowej reperfuzji skutkowały obniżoną ekspresją iNOS i wyższą aktywnością metaboliczną kardiomiocytów w porównaniu do kardiomiocytów nieskontaktowanych z płytkami krwi, co sugeruje możliwy ochronny wpływ płytek krwi

na kardiomiocyty w I/R na drodze iNOS. W celu uzyskania odpowiedzi na pytanie o potencjalny mechanizm tej ochrony należałoby w przyszłości rozszerzyć badania o ekspresję eNOS i oznaczenie stężenia biodostępnego NO i ONOO<sup>-</sup>.

## V. WNIOSKI

1. Warunki niedokrwienia i reperfuzji prowadzą do aktywacji płytek krwi, a czas niedokrwienia koreluje ze stopniem wzmożonego uwalniania PMP.
2. Udział płytek krwi w regulacji ekspresji, translacji i uwalniania MMP-2 i MMP-9 z kardiomiocytów może stanowić jeden z możliwych mechanizmów protekcyjnego działania płytek krwi w warunkach I/R.
3. Jednym z mechanizmów kardioprotekcji podczas I/R jest zwiększenie aktywności metabolicznej kardiomiocytów pod wpływem płytek krwi oraz uwalnianych PMP.
4. Obniżona synteza iNOS, będącego źródłem toksycznego nadtlenoazotynu, pod wpływem płytek krwi przyczynia się do ochrony kardiomiocytów w warunkach I/R.

## VI. Spis wykresów

<b>Wykres 1.</b> Krzywa wzorcowa, równanie krzywej oraz współczynnik determinacji do oznaczania białka metodą Bradforda. ....	62
<b>Wykres 2.</b> Krzywa wzorcowa, równanie krzywej oraz współczynnik determinacji dla oznaczania stężenia MMP-2 metodą ELISA. ....	67
<b>Wykres 3.</b> Krzywa wzorcowa, równanie krzywej oraz współczynnik determinacji dla oznaczenia LDH. ....	69
<b>Wykres 4.</b> Ekspresja aktywowanej GP IIb/IIIa na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT). ....	71
<b>Wykres 5.</b> Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT). ....	72
<b>Wykres 6.</b> Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT). ....	73
<b>Wykres 7.</b> Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R w grupie badanej (HCM+PLT). ....	74
<b>Wykres 8.</b> Zmiany ekspresji aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT). ....	75
<b>Wykres 9.</b> Ekspresja P-selektyny na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R w grupie badanej (HCM+PLT). ....	76
<b>Wykres 10.</b> Zmiany ekspresji P-selektyny na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT). ....	77
<b>Wykres 11.</b> Ekspresja CD63 na powierzchni płytek krwi w warunkach tlenowych oraz w warunkach I/R w grupie badanej (HCM+PLT). ....	78
<b>Wykres 12.</b> Zmiany ekspresji CD63 na powierzchni płytek krwi w grupie badanej (HCM+PLT). ....	79
<b>Wykres 13.</b> Ekspresja antygenu CD61 na powierzchni PMP w buforach po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT). ....	80
<b>Wykres 14.</b> Wpływ czasu niedokrwienia na średnią ekspresję CD61 na powierzchni PMP w grupie badanej (HCM+PLT). ....	80
<b>Wykres 15.</b> Ekspresja aktywowanej GP IIb-IIIa na powierzchni PMP w buforach po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT). ....	81
<b>Wykres 16.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM). ....	82

<b>Wykres 17.</b> Zmiany aktywności MMP-2 w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM). .....	83
<b>Wykres 18.</b> Zmiany aktywności MMP-9 w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM). .....	84
<b>Wykres 19.</b> Zmiany proMMP-2 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT).....	85
<b>Wykres 20.</b> Zmiany aktywności MMP-2 w homogenatach kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (grupa badana, HCM+PLT).....	86
<b>Wykres 21.</b> Zmiany aktywności MMP-9 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów skontaktowanych z płytkami krwi (HCM+PLT). .....	87
<b>Wykres 22.</b> Wpływ czasu niedokrwienia na aktywność MMP-9 w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT). .....	87
<b>Wykres 23.</b> Zmiany proMMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT). .....	88
<b>Wykres 24.</b> Zmiany aktywności MMP-2 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT). .....	89
<b>Wykres 25.</b> Zmiany MMP-9 w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT). .....	90
<b>Wykres 26.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany proMMP-2 oznaczonej w homogenatach kardiomiocytów. ....	91
<b>Wykres 27.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-2 w homogenatach kardiomiocytów. ....	92
<b>Wykres 28.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-9 w homogenatach kardiomiocytów. ....	93
<b>Wykres 29.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (HCM). .....	94
<b>Wykres 30.</b> Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie kontrolnej (HCM). .....	95
<b>Wykres 31.</b> Wpływ czasu niedokrwienia na średnią aktywność MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie kontrolnej (HCM). .....	96
<b>Wykres 32.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 w buforach zebranych po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).....	97
<b>Wykres 33.</b> Zmiany aktywności MMP-9 oznaczonej w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT). .....	98
<b>Wykres 34.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności proMMP-2 oznaczonej w buforach zebranych w warunkach tlenowych i po etapie niedokrwienia. ....	99

<b>Wykres 35.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-9 oznaczonej w przestrzeni pozakomórkowej w warunkach tlenowych i po etapie niedokrwienia...	100
<b>Wykres 36.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM).....	101
<b>Wykres 37.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 w grupie kontrolnej (HCM).....	102
<b>Wykres 38.</b> Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie kontrolnej (HCM).....	103
<b>Wykres 39.</b> Zmiany aktywności MMP-9 w grupie kontrolnej (HCM)..	104
<b>Wykres 40.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 w buforach zebranych po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT).....	105
<b>Wykres 41.</b> Zmiany aktywności proMMP-2 w grupie badanej (HCM+PLT).....	106
<b>Wykres 42.</b> Zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji w grupie badanej (HCM+PLT). .....	107
<b>Wykres 43.</b> Zmiany aktywności MMP-9 w grupie badanej (HCM+PLT) .....	108
<b>Wykres 44.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji. ....	109
<b>Wykres 45.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej po reperfuzji. ....	110
<b>Wykres 46.</b> Stężenie MMP-2 w homogenatach płytek krwi po I/R. ....	111
<b>Wykres 47.</b> Ekspresja genu <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM). .....	112
<b>Wykres 48.</b> Ekspresja genu <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM). .....	113
<b>Wykres 49.</b> Ekspresja genu <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT). .....	114
<b>Wykres 50.</b> Ekspresja genu <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT). .....	115
<b>Wykres 51.</b> Ekspresja genu <i>MMP-2</i> w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT). .....	116
<b>Wykres 52.</b> Ekspresja genu <i>MMP-9</i> w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT). .....	117
<b>Wykres 53.</b> Wpływ płytek krwi na zmiany ekspresji genu <i>MMP-2</i> kardiomiocytów.	118
<b>Wykres 54.</b> Wpływ płytek krwi na zmiany ekspresji genu <i>MMP-9</i> w kardiomiocytach. ....	119

<b>Wykres 55.</b> Zmiany aktywności LDH w grupie kontrolnej (HCM).....	120
<b>Wykres 56.</b> Zmiany aktywności LDH w grupie badanej (HCM+PLT).....	121
<b>Wykres 57.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności LDH w buforach po etapie niedokrwienia.....	122
<b>Wykres 58.</b> Stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM). .....	123
<b>Wykres 59.</b> Stężenie białka całkowitego w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT). .....	124
<b>Wykres 60.</b> Stężenie białka całkowitego w płytkach krwi w grupie badanej (HCM+PLT). .....	125
<b>Wykres 61.</b> Zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM).....	126
<b>Wykres 62.</b> Zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie badanej (HCM+PLT). .....	127
<b>Wykres 63.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany aktywności metabolicznej kardiomiocytów. .....	128
<b>Wykres 64.</b> Zmiany ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach w grupie kontrolnej (HCM).....	130
<b>Wykres 65.</b> Zmiany ekspresji iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT). .....	131
<b>Wykres 66.</b> Wpływ obecności płytek krwi na zmiany w ekspresji białka iNOS w kardiomiocytach.....	132

## VII. Spis tabel

<b>Tabela 1.</b> Grupy metaloproteinaz.....	28
<b>Tabela 2.</b> Współczynniki korelacji rang Spearmana ( <sup>S</sup> ) / Pearsona ( <sup>P</sup> ) dla PMP CD61+ i ekspresji iNOS w kardiomiocytach, aktywności metabolicznej kardiomiocytów oraz aktywności LDH w przestrzeni pozakomórkowej (po etapie niedokrwienia) w grupie badanej.....	134
<b>Tabela 3.</b> Współczynniki korelacji rang Spearmana ( <sup>S</sup> ) lub Pearsona ( <sup>P</sup> ) dla PMP CD61 i MMP-2 oraz MMP-9 kardiomiocytów w grupie badanej. ....	135
<b>Tabela 4.</b> Współczynniki korelacji rang Spearmana ( <sup>S</sup> ) lub Pearsona ( <sup>P</sup> ) dla aktywności MMP-2 i MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej.....	137
<b>Tabela 5.</b> Współczynniki korelacji rang Spearmana ( <sup>S</sup> ) i Pearsona ( <sup>P</sup> ) dla stężenia MMP-2 w płytkach krwi i aktywności MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej. ....	140
<b>Tabela 6.</b> Współczynniki korelacji rang Spearmana ( <sup>S</sup> ) i Pearsona ( <sup>P</sup> ) dla ekspresji genów <i>MMP 2</i> i <i>MMP-9</i> oraz aktywności tych MMP-2 w płytkach krwi i kardiomiocytach.....	141
<b>Tabela 7.</b> Współczynniki korelacji rang Spearmana dla MMP-2, MMP-9 i iNOS, LDH oraz aktywności metabolicznej kardiomiocytów w grupie badanej. ....	144



## VIII. Spis rycin

<b>Rycina 1.</b> Schemat budowy płytki krwi. ....	13
<b>Rycina 2.</b> Czynniki pochodzenia płytkowego o działaniu kardioprotekcyjnym uwalniane w wyniku aktywacji płytek krwi.....	24
<b>Rycina 3.</b> Schemat budowy domenowej wybranych MMP. ....	29
<b>Rycina 4.</b> Schemat rozmieszczenia komórek podczas procedury I/R z zastosowaniem insertów oraz migracji PMP przez membranę insertu. ....	45
<b>Rycina 5.</b> Schemat badania eksperymentalnego.. ....	46
<b>Rycina 6.</b> Przykładowa płytka 12-dołkowa do procedury I/R. ....	47
<b>Rycina 7.</b> Schemat pobierania materiału do badania cytometrycznego płytek krwi. ....	48
<b>Rycina 8.</b> Barwienie fluorescencyjne FDA/DAPI. ....	129
<b>Rycina 9.</b> Barwienie fluorescencyjne iNOS/DAPI. ....	133
<b>Rycina 10.</b> Diagram korelacji pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów w grupie badanej.....	134
<b>Rycina 11.</b> Diagram korelacji pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a ekspresją genu <i>MMP-2</i> kardiomiocytów w grupie badanej. ....	135
<b>Rycina 12.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia. PLT-płytki krwi.....	138
<b>Rycina 13.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w kardiomiocytach a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia w grupie badanej (HCM+PLT).....	138
<b>Rycina 14.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji. ....	139
<b>Rycina 15.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w kardiomiocytach a aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej w grupie badanej (HCM+PLT). ....	139
<b>Rycina 16.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie niedokrwienia a stężeniem MMP-2 w płytkach krwi.....	140
<b>Rycina 17.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością proMMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej po etapie reperfuzji a stężeniem MMP-2 w płytkach krwi. ....	140

<b>Rycina 18.</b> Diagram korelacji pomiędzy ekspresją genu <i>MMP-2</i> w kardiomiocytach a aktywnością MMP-2 oznaczoną w homogenatach kardiomiocytów w grupie kontrolnej (HCM).....	142
<b>Rycina 19.</b> Diagram korelacji pomiędzy ekspresją genu <i>MMP-2</i> w płytkach krwi a aktywnością proMMP-2 w płytkach krwi.....	142
<b>Rycina 20.</b> Diagram korelacji pomiędzy ekspresją genu <i>MMP-2</i> w płytkach krwi a aktywnością MMP-2 w płytkach krwi. ....	143
<b>Rycina 21.</b> Diagram korelacji pomiędzy ekspresją <i>MMP-9</i> w płytkach krwi a aktywnością MMP-9 w płytkach krwi. ....	143
<b>Rycina 22.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a ekspresją białka iNOS w kardiomiocytach w grupie badanej (HCM+PLT).. ....	144
<b>Rycina 23.</b> Diagram korelacji pomiędzy stężeniem MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów. ....	145
<b>Rycina 24.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-2 w płytkach krwi a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów w grupie badanej (HCM+PLT). ....	145
<b>Rycina 25.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-9 w płytkach krwi a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów. ....	146
<b>Rycina 26.</b> Diagram korelacji pomiędzy aktywnością MMP-9 w płytkach krwi a aktywnością LDH w przestrzeni pozakomórkowej. ....	146

## IX. Streszczenie

Płytki krwi są dobrze udokumentowanym w literaturze czynnikiem biorącym udział w patomechanizmie zawału mięśnia sercowego. Jednakże istnieje szereg doniesień naukowych sugerujących ochronny wpływ płytek krwi na mięsień sercowy w zawałe (MI) i uszkodzeniu niedokrwienno–reperfuzyjnym (IRI). Zatem wpływ płytek krwi na kardiomiocyty w MI i IRI nie został do końca poznany.

Celem pracy było zbadanie czy w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji (I/R) płytki krwi ulegają aktywacji, w wyniku której uwalniają mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego (PMP). Kolejnym celem pracy było sprawdzenie, czy płytki krwi wpływają na zmianę w ekspresji genów i aktywności metaloproteinaz (MMP) w kardiomiocytach. Ponadto celem pracy było zbadanie, czy płytki krwi wywierają efekt ochronny na kardiomiocyty poddane I/R.

Materiał do badań stanowiły płytki krwi wyizolowane od 20 zdrowych ochotników oraz hodowlane ludzkie kardiomiocyty (HCM). Komórki poddano procedurze chemicznego I/R składającego się z trzech etapów: stabilizacji, chemicznego niedokrwienia (I), reperfuzji (R). Badanie obejmowało grupę kontrolną – HCM oraz grupę badaną – HCM skontaktowane z płytkami krwi. W grupie badanej zastosowano inserty zawierające płytki krwi, aby zbadać PMP. Komórki w grupie kontrolnej i grupie badanej podzielono na 4 podgrupy, w zależności od czasu trwania niedokrwienia. W przebiegu prowadzonych analiz oceniono: markery aktywacji płytek krwi i PMP (cytometria przepływowa), aktywność MMP-2 i MMP-9 (zymografia żelatynowa), stężenie MMP-2 (ELISA), ekspresję mRNA *MMP-2* i *MMP-9* (real-time PCR), aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), aktywność metaboliczną kardiomiocytów oraz ekspresję tkankową iNOS (mikroskopia fluorescencyjna).

Wykazano wyższą ekspresję wszystkich badanych markerów aktywacji płytek krwi w wyniku I/R. Zaobserwowano zwiększenie ekspresji CD61 na powierzchni PMP wraz z czasem trwania niedokrwienia, co potwierdza wzmożone uwalnianie PMP proporcjonalnie do czasu niedokrwienia. I/R indukowała wyższą aktywność proMMP-2 i MMP-2 w płytkach krwi, natomiast nie wpływała na aktywność MMP-9. Dodatkowo stężenie MMP-2 w płytkach krwi korelowało ujemnie z aktywnością MMP-2 w przestrzeni pozakomórkowej, co stanowi pośredni dowód na pochłanianie MMP przez płytki. Warunki I/R nie miały wpływu na aktywność MMPs, jednak czas trwania niedokrwienia istotnie zwiększał aktywność MMP-9 w kardiomiocytach. Kardiomiocyty

skontaktowane z płytkami krwi wykazywały tendencję do wyższej aktywności proMMP-2 i MMP-2. W przestrzeni pozakomórkowej stwierdzono obniżenie aktywności MMP-2 po etapie niedokrwienia, natomiast wzrost liniowy aktywności MMP-9 wraz z czasem trwania niedokrwienia sugeruje, iż warunki I wpływają odmiennie na aktywność i uwalnianie MMP. Podobne obserwacje uwyskano na etapie reperfuzji. Porównanie aktywności MMP po I i R wskazuje na dalsze uwalnianie proMMP-2 w czasie reperfuzji. Obecność płytek krwi na ogół wpływała na obniżoną aktywność MMP-2 i MMP-9 w przestrzeni pozakomórkowej, co sugeruje pochłanianie MMP przez płytki lub zmniejszone uwalnianie MMP z HCM. Tendencja do niższej ekspresji genu *MMP-2* w kardiomiocytach skontaktowanych z płytkami sugeruje wpływ płytek krwi na HCM na poziomie molekularnym. Natomiast ujemna korelacja ekspresji genów MMP w płytkach krwi z aktywnością MMP w płytkach krwi pośrednio potwierdza hipotezę na temat pochłaniania MMP przez płytki. Zaobserwowano także, iż obecność płytek na ogół wpływała na zwiększenie aktywności LDH w przestrzeni pozakomórkowej, dlatego płytki krwi mogą być źródłem LDH. W obecności płytek krwi w warunkach I/R zaobserwowano wyższą aktywność metaboliczną kardiomiocytów oraz obniżoną ekspresję iNOS w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje potencjalny mechanizm kardioprotekcyjny płytek. Ponadto dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją CD61 na powierzchni PMP a aktywnością metaboliczną kardiomiocytów potwierdza udział PMP w kardioprotekcji.

Podsumowując w warunkach I/R płytki krwi ulegają aktywacji i uwalniają PMP. Adsorbowanie przez płytki krwi MMP uwalnianych przez HCM, zwiększenie aktywności metabolicznej HCM oraz zahamowanie syntezy tkankowej iNOS jako potencjalnego źródła cytotoksyczności stanowią potencjalne mechanizmy kardioprotekcji.

## X. Summary

The presence of platelets as a factor involved in the pathomechanism of myocardial infarction is well documented in the literature. However, there are many scientific reports indicating the protective effect of platelets on the myocardium during myocardial infarction (MI) and ischemia-reperfusion injury (IRI). Therefore, the effect of platelets on cardiomyocytes in MI and IRI is not fully understood.

The aim of the study was to investigate whether, platelets are activated and then release platelet-derived microparticles (PMPs) under conditions of chemical ischemia and reperfusion (I/R). Additionally, the aim was to evaluate the influence of platelets on changes in gene expression and activity of metalloproteinase (MMP) in cardiomyocytes. Furthermore, we aimed to assess whether platelets exert a protective effect on cardiomyocytes subjected to I/R.

The study material consisted of platelets isolated from 20 healthy volunteers and cultured human cardiomyocytes (HCM). The cells were subjected to a chemical I/R procedure consisting of three stages: stabilization, chemical ischemia (I), and reperfusion (R). The study included a control group – HCM and a study group – HCM contacted with platelets. In the study group, inserts containing platelets were used for PMP testing. The cells of the control group and the study group were divided into 4 subgroups depending on the duration of ischemia. During the analyses, the following were assessed: platelet and PMP activation markers (flow cytometry), MMP-2 and MMP-9 activity (gelatin zymography), MMP-2 concentration (ELISA), MMP-2 and MMP-9 mRNA expression (real-time PCR), lactate dehydrogenase (LDH) activity, cardiomyocyte metabolic activity and iNOS tissue expression (fluorescence microscopy).

Higher expression of all tested markers of platelet activation was demonstrated as a result of I/R. An increase in CD61 expression on PMP surface with ischemia duration was observed, confirming the increased release of PMPs in proportion to ischemia time. I/R induced higher proMMP-2 and MMP-2 activity in platelets but did not affect MMP-9 activity. Additionally, the concentration of MMP-2 in platelets correlated negatively with the activity of MMP-2 in the extracellular space, which constitutes an indirect evidence of MMP absorption by platelets. I/R conditions had no effect on MMPs activity, but the duration of ischemia significantly increased MMP-9 activity in cardiomyocytes. Typically, higher proMMP 2 and MMP-2 activity was observed in platelet-contacted cardiomyocytes. In the extracellular space, a decrease in MMP-2 activity was found after

ischemia, while a linear increase in MMP-9 activity with the duration of ischemia suggests that I conditions differentially affect the activity and release of MMPs. Similar observations were obtained at the reperfusion stage. Comparison of MMP activity after I and R showed further release of proMMP-2 during reperfusion. Decreased MMP-2 and MMP-9 activity in the extracellular space was observed in the presence of platelets, suggesting MMP uptake by platelets or reduced MMP release from HCM. There was a trend towards lower MMP-2 gene expression in cardiomyocytes in the study group, suggesting an influence of platelets on HCM at the molecular level. However, the negative correlation of MMP gene expression with MMP activity in platelets indirectly confirms the hypothesis of MMP absorption by platelets. Generally, increased LDH activity has been observed in the extracellular space in the presence of platelets, therefore platelets may be a source of LDH. In the presence of platelets under I/R conditions, higher metabolic activity of cardiomyocytes and reduced iNOS expression compared to the control group were observed, suggesting a potential cardioprotective mechanism of platelets. Moreover, the positive correlation between CD61 expression on the surface of PMPs and metabolic activity of cardiomyocytes confirms the involvement of PMPs in cardioprotection.

In summary, under I/R conditions, platelets become activated and release PMPs. Platelet adsorption of MMPs released from HCM, increased metabolic activity of HCM and inhibition of iNOS tissue synthesis as a potential source of cytotoxicity are potential mechanisms of platelet-induced cardioprotection.

## XI. Wykaz stosowanych skrótów

AA (*ang. arachidonic acid*) – kwas arachidonowy

ACS (*ang. acute coronary syndrome*) – ostry zespół wieńcowy

ADP (*ang. adenosine 5'-diphosphate*) – adenozy-5'-difosforanu

Aero (*ang. aerobic conditions*) – warunki tlenowe

Akt (*ang. Protein kinase B*) – kinaza białkowa B

AMI (*ang. acute myocardial infarction*) – ostry zawał mięśnia sercowego

ATP (*ang. adenosine 5'-triphosphate*) – adenozy-5'-trifosforanu

cTn (*ang. cardiac troponins*) – troponiny sercowe

cz. – czynnik

DAPI (*ang. 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*) - 4',6-diamidyno-2-fenylindol

eNOS (*ang. endothelial nitric oxide synthase*) – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu

ESC (*ang. European Society of Cardiology*) – Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne

EV (*ang. extracellular vesicles*) – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

FDA (*ang. fluorescein diacetate*) – dioctan fluoresceiny

GAPDH (*ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa

GDP (*ang. guanosine 5'-diphosphate*) – guanozy-5'-difosforan

GP (*ang. Glycoprotein*) – glikoproteina

GTP (*ang. guanosine 5'-triphosphate*) – guanozy-5'-trifosforan

HCM (*ang. human cardiac myocytes*) – ludzkie miocyty serca

HIF (*ang. hypoxia-inducible factors*) – czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją

ICAM-1 (*ang. intercellular adhesion molecule-1*) – cząsteczki adhezji międzykomórkowej – 1

iNOS (*ang. inducible nitric oxide synthase*) – indukowana syntaza tlenku azotu

IPC *ang. (ischemic preconditioning)* – prekondycjonowanie niedokrwienne

IPoC *ang. (ischemic postconditioning)* – postkondycjonowanie niedokrwienne

I/R *ang. (ischemia/reperfusion)* – niedokrwienie i reperfuzja

IRI (*ang. ischemia-reperfusion injury*) – uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne

JPH-2 (*ang. Junctophilin-2*) – Junktofilina-2

LDH (*ang. lactate dehydrogenase*) – dehydrogenaza mleczanowa

LV (*ang. left ventricle*) – lewa komora

MAC-1 (*ang. macrophage-1 antigen*) – antygen makrofagalny 1

MI (*ang. myocardial infarction*) – zawał mięśnia sercowego

MLC1 (*ang. myosin light chain 1*) – łańcuchy lekkie miozyny-1

MMP (*ang. matrix metalloproteinases*) – metalloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej

MP (*ang. microparticles*) – mikrocząsteczki

MPTP (*ang. mitochondrial permeability transition pore*) – megakanał mitochondrialny

mRNA (*ang. messenger RNA*) – informacyjny RNA

miRNA (*ang. microRNA*) – mikroRNA

NAD (*ang. nicotinamide adenine dinucleotide*) – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NADPH (*ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

nNOS (*ang. neuronal nitric oxide synthase*) – neuronalna syntaza tlenku azotu

NO (*ang. nitric oxide*) – tlenek azotu

OCS (*ang. open canalicular system*) – układ otwartych kanalików

ONOO<sup>-</sup> (*ang. peroxynitrite*) – nadtlenoazotyn

PAF (*ang. platelet activating factor*) – czynnik aktywujący płytki krwi



PAFRs (*ang. platelet activating factor receptors*) – receptory czynnika aktywującego płytki krwi

PAI-1 (*ang. plasminogen activator inhibitor type 1*) – inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1

Pak1 (*ang. P21-activated kinase*) – kinaza 1 aktywowana przez P21

PAR1 (*ang. protease-activated receptor 1*) – receptor aktywowany przez proteazy 1

PCI (*ang. percutaneous coronary intervention*) – przezskórna interwencja wieńcowa

PDGF (*ang. platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu

PGE2 (*ang. prostaglandin E2*) – prostaglandyna E2

PGI<sub>2</sub> (*ang. prostacyclin*) – prostacyklina

PKC (*ang. protein kinase C*) – kinazy białkowej C

PLT (*ang. platelets*) – wyizolowane płytki krwi

PMP (*ang. platelet-derived microparticles*) – mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego

PRP (*ang. platelet rich plasma*) – osocze bogatopłytkowe

PSGL-1 (*ang. P-selectin glycoprotein ligand-1*) – glikoproteinowy ligand-1 P-selektyny

RIPC (*ang. Remote Ischemic Pre-Conditioning*) – zdalne wstępne kondycjonowanie niedokrwienne, prekondycjonowanie zwane „hartowaniem na odległość”

RISK (*ang. reperfusion injury salvage kinases*) – kinazy przeżycia po uszkodzeniu reperfuzyjnym

RNA (*ang. ribonucleic acid*) – kwasy rybonukleinowe

ROS (*ang. reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

SAFE (*ang. survivor activating factor enhancement*) – wzmocnienie czynnika aktywującego przeżycie

SDF-1 $\alpha$  (*ang. stromal cell-derived factor-1 alpha*) – zrębowy czynnik 1 alfa

SOD (*ang. superoxide dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa

S1P (*ang. sphingosine-1-phosphate*) – sfingozyno-1-fosforan

SR (*ang. sarcoplasmic reticulum*) – siateczka sarkoplazmatyczna

SERCA2a (*ang. sarco/endoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase 2a*) – ATP-aza  
– zlokalizowana w błonie siateczki śródplazmatycznej

STEMI (*ang. ST-elevation myocardial infarction*) – zawał mięśnia sercowego z  
uniesieniem odcinka ST

TF (*ang. tissue factor*) – czynnik tkankowy

TGF- $\beta$  (*ang. transforming growth factor beta*) – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$

TIMPs (*ang. tissue inhibitors of metalloproteinases*) – tkankowe inhibitory  
metaloproteinaz

TNF- $\alpha$  (*ang. tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$

TXA2 (*ang. thromboxane A2*) – tromboksan A2

URL (*ang. upper reference limits*) – górna granica przedziału referencyjnego

VCAM (*ang. vascular cellular adhesion molecule-1*) – cząsteczka adhezji komórkowej  
naczyń-1

VEGF (*ang. vascular endothelial-derived growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłónka

vWF (*ang. von Willebrand factor*) – czynnik von Willebranda

## XII. Bibliografia

1. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol 210. ; 2012:3-22. doi:10.1007/978-3-642-29423-5\_1.
2. Saluk J, Bijak M, Ponczek MB, Wachowicz B. The formation, metabolism and the evolution of blood platelets. *Postepy Hig Med Dosw*. 2014;68:384-391. doi:10.5604/17322693.1098145.
3. Linden MD. Platelet physiology. *Methods Mol Biol*. 2013;992:13-30. doi:10.1007/978-1-62703-339-8\_2.
4. White JG, Escolar G. Current concepts of platelet membrane response to surface activation. *Platelets*. 1993;4(4):175-189. doi:10.3109/09537109309013215.
5. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106(5):1604-1611. doi:10.1182/blood-2004-03-1095.
6. White JG. The submembrane filaments of blood platelets. *Am J Pathol*. 1969;56(2):267-277.
7. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(3):299-309. doi:10.1007/s12265-012-9445-9.
8. White JG, Key NS, King RA, Vercellotti GM. The White platelet syndrome: A new autosomal dominant platelet disorder - I. Structural abnormalities. *Platelets*. 2004;15(3):173-184. doi:10.1080/09537100410001682805.
9. White JG. Golgi complexes in hypogranular platelet syndromes. *Platelets*. 2005;16(1):51-60. doi:10.1080/0953710042000260173.
10. Behnke O. Electron microscopic observations on the membrane systems of the rat blood platelet. *Anat Rec*. 1967;158(2):121-137. doi:10.1002/ar.1091580203.
11. Behnke O. An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastructure Res*. 1968;24(5-6):412-433. doi:10.1016/S0022-5320(68)80046-2.
12. Santos-Martínez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. *Thromb Res*. 2008;121(4):535-542. doi:10.1016/j.thromres.2007.06.002.
13. Michelson AD. Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Semin Thromb Hemost*. 1992;18(1):18-27. doi:10.1055/s-2007-1002406.

14. Hartwig JH, DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: Structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol.* 1991;112(3):407-425. doi:10.1083/jcb.112.3.407.
15. Barkalow KL, Italiano JE, Chou DE, Matsuoka Y, Bennett V, Hartwig JH.  $\alpha$ -adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *J Cell Biol.* 2003;161(3):557-570. doi:10.1083/jcb.200211122.
16. Haydon GB, Taylor DA. Microtubules in hamster platelets. *J Cell Biol.* 1965;26(2):673-676. doi:10.1083/jcb.26.2.673.
17. Behnke O. Further studies on microtubules. A marginal bundle in human and rat thrombocytes. *J Ultrastructure Res.* 1965;13(5-6):469-477. doi:10.1016/S0022-5320(65)90009-2.
18. Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol.* 1986;123(1):86-94.
19. White J, Krumwiede M. Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood.* 1987;69(4):1196-1203. doi:10.1182/blood.v69.4.1196.1196.
20. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1152-1160. doi:10.1161/01.ATV.0000075965.88456.48.
21. Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. *Annu Rev Med.* 1979;30(Table 1):119-134. doi:10.1146/annurev.me.30.020179.001003.
22. Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood.* 1996;87(12):4925-4936. doi:10.1182/blood.v87.12.4925.bloodjournal87124925.
23. Michelson AD, Furman MI. Markers of platelet activation and granule secretion. *Platelet Funct.* Published online 2007:301-314. doi:10.1007/978-1-59259-917-2\_13.
24. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(2):154-169. doi:10.1038/nrd2957.
25. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the  $\beta$ 2- integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996;88(1):146-157. doi:10.1182/blood.v88.1.146.bloodjournal881146.
26. Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):23-33. doi:10.1055/s-0037-1616197.
27. Dean GE, Fishkes H, Nelson PJ, Rudnick G. The hydrogen ion-pumping adenosine triphosphatase of platelet dense granule membrane. Differences from F1F0- and phosphoenzyme-type ATPases. *J Biol Chem.* 1984;259(15):9569-9574. doi:10.1016/s0021-9258(17)42738-4.

28. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*. 2006;312(5770):104-107. doi:10.1126/science.1123842.
29. Roth GA, Mensah GA, Fuster V. The global burden of cardiovascular diseases and risks: a compass for global action. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2980-2981. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.021.
30. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2019;40(3):237-269. doi:10.1093/eurheartj/ehy462
31. Auer J, Punzengruber C, Berent R, Weber T, Eber B. Multiple complex coronary plaques in a patient with acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 2002;16(5):211-213. doi:10.1007/s003800200026.
32. Gould KL, Gewirtz H, Narula J. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In: Fuster V, Harrington RA, Narula J, Eapen ZJ. eds. *Hurst's The Heart*, 14e. McGraw-Hill Education; 2017. Accessed February 22, 2023. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2046&sectionid=176555290>.
33. Golfaroush P, Yellon DM, Davidson SM. Mouse models of atherosclerosis and their suitability for the study of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2020;115(6):1-24. doi:10.1007/s00395-020-00829-5.
34. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013;123(1):92-100. doi:10.1172/JCI62874.
35. Avkiran M, Marber MS. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors for cardioprotective therapy: Progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(5):747-753. doi:10.1016/S0735-1097(02)01693-5.
36. Avkiran M. Protection of the ischaemic myocardium by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors: Potential mechanisms of action. *Basic Res Cardiol*. 2001;96(4):306-311. doi:10.1007/s003950170037.
37. Sabatine MS, Braunwald E. Thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) study group: JACC focus seminar 2/8. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(22):2822-2845. doi:10.1016/j.jacc.2021.01.060.
38. Doenst T, Haverich A, Serruys P, et al. PCI and CABG for treating stable coronary artery disease: JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(8):964-976. doi:10.1016/j.jacc.2018.11.053.
39. Mackman N, Bergmeier W, Stouffer GA, Weitz JI. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(5):333-352. doi:10.1038/s41573-020-0061-0.
40. Zhang Q, Wang L, Wang S, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1). doi:10.1038/s41392-022-00925-z.

41. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol.* 2010;106(3):360-368. doi:10.1016/j.amjcard.2010.03.032.
42. Augustynek B, Wrzosek A, Koprowski P, et al. What we don't know about mitochondrial potassium channels? *Postepy Biochem.* 2016;62(2):189-198.
43. Irani K, Xia Y, Zweier JL, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science.* 1997;275(5306):1649-1652. doi:10.1126/science.275.5306.1649.
44. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):446-456. doi:10.1016/S0008-6363(00)00078-X.
45. Gunata M, Parlakpınar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. *Cell Biochem Funct.* 2021;39(2):190-217. doi:10.1002/cbf.3587.
46. Isbir CS, Doğan R, Farsak B, Aydın M, Kiliç K. The protective effect of lisinopril on membrane-bound enzymes in myocardial preservation. *Cell Biochem Funct.* 2000;18(2):85-91. doi:10.1002/(SICI)1099-0844(200006)18:2<85::AID-CBF853>3.0.CO;2-Y.
47. Hess ML, Okabe E, Kontos HA. Proton and free oxygen radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol.* 1981;13(8):767-772. doi:10.1016/0022-2828(81)90258-3.
48. Rosen H, Klebanoff SJ. Hydroxyl radical generation by polymorphonuclear leukocytes measured by electron spin resonance spectroscopy. *J Clin Invest.* 1979;64(6):1725-1729. doi:10.1172/JCI109637.
49. Zweier JL, Talukder MAH. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006;70(2):181-190. doi:10.1016/j.cardiores.2006.02.025.
50. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS.* 1996;76:99-114. doi:10.1007/978-3-0348-8988-9\_7.
51. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2006;290(5):2024-2034. doi:10.1152/ajpheart.00683.2005.
52. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Apr;35(4):339-41. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00043-9.
53. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 1995;307(1):93-98. doi:10.1042/bj3070093.

54. Qian T, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1997;273(6 42-6):1783-1792. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.6.c1783.
55. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine a at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010;24(1):85-87. doi:10.1007/s10557-010-6219-y.
56. Brookes PS, Padilla Salinas E, Darley-USmar K, et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 2000;275(27):20474-20479. doi:10.1074/jbc.M001077200.
57. Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide and apoptosis. *Vitam Horm*. 1997;57(C):49-77. doi:10.1016/S0083-6729(08)60640-8.
58. Yabuki M, Tsutsui K, Horton AA, Yoshioka T, Utsumi K. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radic Res*. 2000;32(6):507-514. doi:10.1080/10715760000300511.
59. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):481-497. doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.011.
60. Hayward R, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Lefer AM. Recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc Res*. 1999;41(1):65-76. doi:10.1016/S0008-6363(98)00266-1.
61. Oostingh GJ, Pozgajova M, Ludwig RJ, et al. Diminished thrombus formation and alleviation of myocardial infarction and reperfusion injury through antibody- or small-molecule-mediated inhibition of selectin-dependent platelet functions. *Haematologica*. 2007;92(4):502-512. doi:10.3324/haematol.10741.
62. Ying SQ, Fang L, Xiang MX, Xu G, Shan J, Wang JA. Protective effects of magnesium against ischaemia-reperfusion injury through inhibition of P-selectin in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(12):1234-1239. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04697.x.
63. Zuchtriegel G, Uhl B, Pühr-Westerheide D, Pörnbacher M, Lauber K, Krombach F, Reichel CA. Platelets guide leukocytes to their sites of extravasation. *PLoS Biol*. 2016 May 6;14(5):e1002459. doi: 10.1371/journal.pbio.1002459.
64. Heinzmann D, Noethel M, Ungern-Sternberg S V., et al. CD147 is a novel interaction partner of integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 mediating leukocyte and platelet adhesion. *Biomolecules*. 2020;10(4):7-12. doi:10.3390/biom10040541.
65. Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(1):59-68. doi:10.4065/81.1.59.
66. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-632. doi:10.1111/joim.12296.

67. Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest.* 1975;32(3):339-351.
68. Stel H, Sakariassen K, de Groot P, van Mourik J, Sixma J. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood.* 1985;65(1):85-90. doi:10.1182/blood.V65.1.85.85.
69. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998;94(5):657-666. doi:10.1016/S0092-8674(00)81607-4.
70. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1440-1445. doi:10.1172/JCI114318.
71. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* 1986;46(6):913-920. doi:10.1016/0092-8674(86)90073-5.
72. Chen J, López JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation.* 2005;12(3):235-246. doi:10.1080/10739680590925484.
73. Léon C, Hechler B, Freund M, et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y1 receptor-null mice. *J Clin Invest.* 1999;104(12):1731-1737. doi:10.1172/JCI8399.
74. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science.* 2002;296(5567):539-541. doi:10.1126/science.1068711.
75. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985;260(20):11107-11114.
76. Vezza R, Roberti R, Nenci GG, Gresele P. Prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C. *Blood.* 1993;82(9):2704-2713. doi:10.1182/blood.v82.9.2704.2704.
77. Gresele P, Falcinelli E, Momi S. Potentiation and priming of platelet activation: a potential target for antiplatelet therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(7):352-360. doi:10.1016/j.tips.2008.05.002.
78. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):498-511. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.036.
79. Heindl B, Zahler S, Welsch U, Becker BF. Disparate effects of adhesion and degranulation of platelets on myocardial and coronary function in postischemic hearts. *Cardiovasc Res.* 1998;38(2):383-394. doi:10.1016/S0008-6363(98)00032-7.



80. Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge. *Eur Heart J*. 2017;38(11):774-784. doi:10.1093/eurheartj/ehw224.
81. Ziegler M, Alt K, Paterson BM, et al. Highly sensitive detection of minimal cardiac ischemia using positron emission tomography imaging of activated platelets. *Sci Rep*. 2016;6(December):1-10. doi:10.1038/srep38161.
82. Xu Y, Huo Y, Toufektsian M, et al. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Circulation*. 2023;229(3):692-699. doi:10.1152/ajpheart.00634.2005.
83. Ziegler M, Wang X, Peter K. Platelets in cardiac ischaemia/reperfusion injury: A promising therapeutic target. *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1178-1188. doi:10.1093/cvr/cvz070.
84. Schanze N, Bode C, Duerschmied D. Platelet contributions to myocardial ischemia/reperfusion injury. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1-9. doi:10.3389/fimmu.2019.01260.
85. Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1128-1134. doi:10.1172/JCI115412.
86. Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*. 2014;346(6214):1234-1238. doi:10.1126/science.1256478.
87. Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIbbeta3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest*. 1997;100(8):2085-2093. doi:10.1172/JCI119742.
88. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Iba is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. 2000;192(2):193-204. doi:10.1084/jem.192.2.193.
89. Köhler D, Straub A, Weissmüller T, et al. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123(22):2579-2590. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014555.
90. Lefer AM, Campbell B, Scalia R, Lefer DJ. Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion role of selectins. *Circulation*. 1998;98(13):1322-1328. doi:10.1161/01.CIR.98.13.1322.
91. Seligmann C, Leitsch T, Kusus M, et al. PMN/Platelets coinjected in guinea pig hearts exposed to low-flow ischemia have no additive cardiodepressive effect. *J Vasc Res*. 2003;40(6):501-508. doi:10.1159/000074890.

92. Mauler M, Herr N, Schoenichen C, et al. Platelet serotonin aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil degranulation. *Circulation*. 2019;139(7):918-931. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033942.
93. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, et al. Risk stratification of patients with acute myocardial infarction by quantification of circulating monocyte-platelet aggregates. *Int J Cardiol*. 2007;115(1):101-102. doi:10.1016/j.ijcard.2005.12.017.
94. Seligmann C, Prechtel G, Kusus-Seligmann M, Daniel WG. A myocardial ischemia-and reperfusion-induced injury is mediated by reactive oxygen species released from blood platelets. *Platelets*. 2013;24(1):37-43. doi:10.3109/09537104.2012.658107.
95. Mirabet M, Garcia-Dorado D, Inseste J, et al. Platelets activated by transient coronary occlusion exacerbate ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2002;283(3 52-3):1134-1141. doi:10.1152/ajpheart.00065.2002.
96. Muessig JM, Kaya S, Moellhoff L, et al. A model of blood component–heart interaction in cardiac ischemia–reperfusion injury using a Langendorff-based ex vivo assay. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2020;25(2):164-173. doi:10.1177/1074248419874348.
97. Yang B, Mehta P, Mehta JL. Platelet-mediated cardioprotective effect against ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts: Role of platelet number and contribution of supernatant of aggregated platelets. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1998;3(1):23-28. doi:10.1177/107424849800300103.
98. Yang BC, Mehta JL. Platelet-derived adenosine contributes to the cardioprotective effects of platelets against ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;24(5):779-785. doi:10.1097/00005344-199424050-00013.
99. Yang BC, Zander DS, Mehta JL. Hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in cultured adult rat myocytes and the protective effect of platelets and transforming growth factor- $\beta$ 1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291(2):733-738.
100. Döring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol*. 2014;5 JUN(June):1-23. doi:10.3389/fphys.2014.00212.
101. Walsh T, Poole A. Platelets protect cardiomyocytes from ischemic damage. *TH Open*. 2017;01(01):e24-e32. doi:10.1055/s-0037-1603928.
102. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110(21):3300-3305. doi:10.1161/01.CIR.0000147780.30124.CF.

103. Geisler T, Fekecs L, Wurster T, et al. Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI. *Eur J Radiol.* 2012;81(4):e486-e490. doi:10.1016/j.ejrad.2011.06.019.
104. Koitabashi N, Danner T, Zaiman AL, et al. Pivotal role of cardiomyocyte TGF- $\beta$  signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2301-2312. doi:10.1172/JCI44824.
105. Mehta JL, Yang BC, Strates BS, Mehta P. Role of TGF- $\beta$ 1 in platelet-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Growth Factors.* 1998;16(3):179-190. doi:10.3109/08977199909002128.
106. Rath D, Chatterjee M, Müller I, et al. Platelet expression of transforming growth factor beta 1 is enhanced and associated with cardiovascular prognosis in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):754-759. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.021.
107. Urtz N, Gaertner F, Von Bruehl ML, et al. Sphingosine 1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 intrinsically controls platelet aggregation in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2015;117(4):376-387. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306901.
108. Tani M, Sano T, Ito M, Igarashi Y. Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2458-2467. doi:10.1194/jlr.M500268-JLR200.
109. Cavalli a L, Ligutti J a, Gellings NM, et al. The role of TNF $\alpha$  and sphingolipid signaling in cardiac hypoxia: evidence that cardiomyocytes release TNF $\alpha$  and sphingosine. *Basic Appl Myol.* 2002;12(4):167-175.
110. Karliner JS, Honbo N, Summers K, Gray MO, Goetzl EJ. The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(9):1713-1717. doi:10.1006/jmcc.2001.1429.
111. Jin ZQ, Goetzl EJ, Karliner JS. Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation.* 2004;110(14):1980-1989. doi:10.1161/01.CIR.0000143632.06471.93.
112. Jin ZQ, Zhou HZ, Zhu P, et al. Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC $\epsilon$  knockout mouse hearts. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2002;282(6 51-6):1970-1977. doi:10.1152/ajpheart.01029.2001.
113. Knapp M. Cardioprotective role of sphingosine-1-phosphate. *J Physiol Pharmacol.* 2011;62(6):601-607.
114. Vessey DA, Li L, Honbo N, Karliner JS. Sphingosine 1-phosphate is an important endogenous cardioprotectant released by ischemic pre- and postconditioning. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009;297(4). doi:10.1152/ajpheart.00358.2009.

115. Means CK, Xiao CY, Li Z, et al. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2007;292(6):2944-2951. doi:10.1152/ajpheart.01331.2006.
116. Somers SJ, Frias M, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Interplay between SAFE and RISK pathways in sphingosine-1-phosphate-induced cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2012;26(3):227-237. doi:10.1007/s10557-012-6376-2.
117. Egom EEA, Mohamed TMA, Mamas MA, et al. Activation of Pak1/Akt/eNOS signaling following sphingosine-1-phosphate release as part of a mechanism protecting cardiomyocytes against ischemic cell injury. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2011;301(4). doi:10.1152/ajpheart.01003.2010.
118. Cohen M V., Yang XM, White J, Yellon DM, Bell RM, Downey JM. Cangrelor-mediated cardioprotection requires platelets and sphingosine phosphorylation. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016;30(2):229-232. doi:10.1007/s10557-015-6633-2.
119. Penna C, Aragno M, Cento AS, et al. Ticagrelor conditioning effects are not additive to cardioprotection induced by direct NLRP3 inflammasome inhibition: role of RISK, NLRP3, and redox cascades. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/9709542.
120. Kitakaze M, Hori M. Adenosine therapy: A new approach to chronic heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000;9(11):2519-2535. doi:10.1517/13543784.9.11.2519.
121. Zang WJ, Sun L, Yu XJ. Cardioprotection of ischemic postconditioning and pharmacological post-treatment with adenosine or acetylcholine. *Sheng Li Xue Bao*. 2007;59(5):593-600.
122. Evangelou AM. Platelet-activating factor (PAF): Implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids*. 1994;50(1):1-28. doi:10.1016/0952-3278(94)90101-5.
123. Penna C, Bassino E, Alloatti G. Platelet activating factor: The good and the bad in the ischemic/reperfused heart. *Exp Biol Med*. 2011;236(4):390-401. doi:10.1258/ebm.2011.010316.
124. Penna C, Alloatti G, Cappello S, et al. Platelet-activating factor induces cardioprotection in isolated rat heart akin to ischemic preconditioning: Role of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C activation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2005;288(5 57-5):2512-2520. doi:10.1152/ajpheart.00599.2004.
125. Zhang W, Chen C, Wang J, Liu L, He Y, Chen Q. Mitophagy in cardiomyocytes and in platelets: A major mechanism of cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Physiology*. 2018;33(2):86-98. doi:10.1152/physiol.00030.2017.
126. Zhang W, Ren H, Xu C, et al. Hypoxic mitophagy regulates mitochondrial quality and platelet activation and determines severity of I/R heart injury. *Elife*. 2016;5(DECEMBER2016):1-20. doi:10.7554/eLife.21407.

127. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol.* 2014;2(1):206-210. doi:10.1016/j.redox.2013.12.026.
128. Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, et al. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2002;23(3):371-376. doi:10.1016/S0197-4580(01)00314-1.
129. Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14(2):177-185. doi:10.1038/ncb2422.
130. Zhou H, Li D, Zhu P, et al. Melatonin suppresses platelet activation and function against cardiac ischemia/reperfusion injury via PPAR $\gamma$ /FUNDC1/mitophagy pathways. *J Pineal Res.* 2017;63(4):e12438. doi:10.1111/jpi.12438.
131. George M, Ganesh MR, Sridhar A, et al. Evaluation of endothelial and platelet derived microparticles in patients with acute coronary syndrome. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(12):OC09-OC13. doi:10.7860/JCDR/2015/14493.6920.
132. Finkielsztejn A, Mascarenhas L, Butin-Israeli V, Sumagin R. Isolation and characterization of neutrophil-derived microparticles for functional studies. *J Vis Exp.* 2018;2018(133):1-7. doi:10.3791/56949.
133. Olatunya OS, Lanaro C, Longhini AL, et al. Red blood cells microparticles are associated with hemolysis markers and may contribute to clinical events among sickle cell disease patients. *Ann Hematol.* 2019;98(11):2507-2521. doi:10.1007/s00277-019-03792-x.
134. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1). doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
135. Pan Y, Wang Y, Wang Y, et al. Platelet-derived microvesicles (PMVs) in cancer progression and clinical applications. *Clin Transl Oncol.* 2023;25(4):873-881. doi:10.1007/s12094-022-03014-3.
136. Alexandru N, Badila E, Weiss E, Cochior D, Stepień E, Georgescu A. Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated microRNAs as active players Dedicated to the 150th anniversary of the Romanian Academy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;472(1):1-10. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.038.
137. Jang S, Palzer EF, Rudser KD, et al. Relationship of endothelial microparticles to obesity and cardiovascular disease risk in children and adolescents. *J Am Heart Assoc.* 2022;11(22). doi:10.1161/JAHA.122.026430.

138. Zaldivia MTK, McFadyen JD, Lim B, Wang X, Peter K. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4(November):1-13. doi:10.3389/fcvm.2017.00074.
139. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation.* 1997;96(10):3534-3541. doi:10.1161/01.CIR.96.10.3534.
140. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998;102(1):136-144. doi:10.1172/JCI2592.
141. Jung C, Sörensson P, Saleh N, Arheden H, Rydén L, Pernow J. Circulating endothelial and platelet derived microparticles reflect the size of myocardium at risk in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2012;221(1):226-231. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.025.
142. Hartopo AB, Puspitawati I, Gharini PP, Setianto BY. Platelet microparticle number is associated with the extent of myocardial damage in acute myocardial infarction. *Arch Med Sci.* 2016 Jun 1;12(3):529-37. doi: 10.5114/aoms.2016.59926.
143. Empana JP, Boulanger CM, Tafflet M, et al. Microparticles and sudden cardiac death due to coronary occlusion. The TIDE (Thrombus and Inflammation in sudden DEath) study. *Eur Hear journal Acute Cardiovasc care.* 2015;4(1):28-36. doi:10.1177/2048872614538404.
144. Geng XY, Xiao N, Han Y, Li YJ. Platelet Microparticles: A Tool to Predict Infarction Area in Rats. *J Investig Surg.* 2021;34(1):64-69. doi:10.1080/08941939.2019.1606369.
145. Christersson C, Thulin Å, Siegbahn A. Microparticles during Long-Term Follow-Up after acute myocardial infarction: Association to atherosclerotic burden and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost.* 2017;117(8):1571-1581. doi:10.1160/TH16-11-0837.
146. Vélez P, Parguiña AF, Ocaranza-Sánchez R, et al. Identification of a circulating microvesicle protein network involved in ST-elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):716-726. doi:10.1160/TH14-04-0337.
147. Porto I, Biasucci LM, De Maria GL, et al. Intracoronary microparticles and microvascular obstruction in patients with ST elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous intervention. *Eur Heart J.* 2012;33(23):2928-2938. doi:10.1093/eurheartj/ehs065.
148. Ma F, Liu H, Shen Y, Zhang Y, Pan S. Platelet-derived microvesicles are involved in cardio-protective effects of remote preconditioning. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):10832-10839.
149. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res.* 2005;67(1):30-38. doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.007.

150. Liu M, Wang Y, Zhu Q, et al. Protective effects of circulating microvesicles derived from ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2018;23(7-8):436-448. doi:10.1007/s10495-018-1469-4.
151. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962;48:1014-1022. doi:10.1073/pnas.48.6.1014.
152. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug Discov Today*. 2011;16(17-18):762-778. doi:10.1016/j.drudis.2011.06.009.
153. Jung P, Zimowska M. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej w rozwoju, fizjologii i procesach degeneracyjnych mięśni szkieletowych. *Postep Biochem*. 2016;62(1):25-35.
154. Śliwowska I, Kopczyński Z. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej - Charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi. *Wspolczesna Onkol*. 2005;9(8):327-335.
155. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol*. 2007;26(8):587-596. doi:10.1016/j.matbio.2007.07.001.
156. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020;9(5):1076. doi:10.3390/cells9051076.
157. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2010;1803(1):55-71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
158. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol*. 1995;248(C):496-510. doi:10.1016/0076-6879(95)48032-3.
159. Apte SS, Parks WC. Metalloproteinases: A parade of functions in matrix biology and an outlook for the future. *Matrix Biol*. 2015;44-46:1-6. doi:10.1016/j.matbio.2015.04.005.
160. Klein G, Schmal O, Aicher WK. Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization. *Matrix Biol*. 2015;44-46:175-183. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.011.
161. Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol*. 2015;44-46(10):184-190. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.022.
162. Roy R, Zhang B, Moses MA. Making the cut: Protease-mediated regulation of angiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):608-622. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.022.

163. Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(1):27-45. doi:10.1093/molehr/3.1.27.
164. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-233. doi:10.1038/nrm2125.
165. Bozzi M, Sciandra F, Brancaccio A. Role of gelatinases in pathological and physiological processes involving the dystrophin-glycoprotein complex. *Matrix Biol.* 2015;44-46:130-137. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.005.
166. McGarry Houghton A. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. *Matrix Biol.* 2015;44-46:167-174. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.002.
167. Le, Nghia TV. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci.* 2007;12(1):1475. doi:10.2741/2161.
168. Sawicki G, Sanders EJ, Salas E, Wozniak M, Rodrigo J, Radomski MW. Localization and translocation of MMP-2 during aggregation of human platelets. *Thromb Haemost.* 1998;80(5):836-839. doi:10.1055/s-0037-1615367.
169. Gresele P, Falcinelli E, Sebastiano M, Momi S. Matrix metalloproteinases and platelet function. In: ; 2017:133-165. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.01.002.
170. FALCINELLI E, GUGLIELMINI G, TORTI M, GRESELE P. Intraplatelet signaling mechanisms of the priming effect of matrix metalloproteinase-2 on platelet aggregation. *J Thromb Haemost.* 2005;3(11):2526-2535. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01614.x.
171. Momi S, Falcinelli E, Giannini S, et al. Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. *J Exp Med.* 2009;206(11):2365-2379. doi:10.1084/jem.20090687.
172. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature.* 1997;386(6625):616-619. doi:10.1038/386616a0.
173. Wrzyszc A, Wozniak M. On the origin of matrix metalloproteinase-2 and -9 in blood platelets. *Platelets.* 2012;23(6):467-474. doi:10.3109/09537104.2012.682103.
174. Soslau G, Mason C, Lynch S, et al. Intracellular matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates human platelet activation via hydrolysis of talin. *Thromb Haemost.* 2013;111(1):140-153. doi:10.1160/TH13-03-0248.
175. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(2):579-621. doi:10.1152/physrev.00028.2003.



176. Sebastiano M, Momi S, Falcinelli E, Bury L, Hoylaerts MF, Gresele P. A novel mechanism regulating human platelet activation by MMP-2-mediated PAR1 biased signaling. *Blood*. 2017;129(7):883-895. doi:10.1182/blood-2016-06-724245.
177. Falcinelli E, Giannini S, Boschetti E, Gresele P. Platelets release active matrix metalloproteinase-2 in vivo in humans at a site of vascular injury: Lack of inhibition by aspirin. *Br J Haematol*. 2007;138(2):221-230. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06632.x.
178. Gresele P, Falcinelli E, Loffredo F, et al. Platelets release matrix metalloproteinase-2 in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes: Possible role in sustained platelet activation. *Eur Heart J*. 2011;32(3):316-325. doi:10.1093/eurheartj/ehq390.
179. Guglielmini G, Appolloni V, Momi S, et al. Matrix metalloproteinase-2 enhances platelet deposition on collagen under flow conditions. *Thromb Haemost*. 2016;115(2):333-343. doi:10.1160/TH15-04-0300.
180. Sheu JR, Fong TH, Liu CM, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: Regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies. *Br J Pharmacol*. 2004;143(1):193-201. doi:10.1038/sj.bjp.0705917.
181. Klvegren H, Jönsson S, Jonasson L. Release of matrix metalloproteinases-1 and-2, but not-9, from activated platelets measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Platelets*. 2011;22(8):572-578. doi:10.3109/09537104.2011.583300.
182. Cecchetti L, Tolley ND, Michetti N, Bury L, Weyrich AS, Gresele P. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: A mechanism for regulating synthetic events. *Blood*. 2011;118(7):1903-1911. doi:10.1182/blood-2010-12-324517.
183. Mastenbroek TG, Feijge MAH, Kremers RMW, et al. Platelet-associated matrix metalloproteinases regulate thrombus formation and exert local collagenolytic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(12):2554-2561. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306153.
184. Lee YM, Lee JJ, Shen MY, Hsiao G, Sheu JR. Inhibitory mechanisms of activated matrix metalloproteinase-9 on platelet activation. *Eur J Pharmacol*. 2006;537(1-3):52-58. doi:10.1016/j.ejphar.2006.03.031.
185. Euler G, Locquet F, Kociszewska J, et al. Matrix metalloproteinases repress hypertrophic growth in cardiac myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2021;35(2):353-365. doi:10.1007/s10557-020-07138-y.
186. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(5):728-735. doi:10.1016/0955-0674(95)80116-2.
187. Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res*. 1997;33(2):422-432. doi:10.1016/S0008-6363(96)00254-4.

188. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, Van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem*. 2001;276(31):29596-29602. doi:10.1074/jbc.M102417200.
189. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, et al. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(5):826-834. doi:10.1016/j.bcp.2008.11.004.
190. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JRB, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*. 2002;106(12):1543-1549. doi:10.1161/01.CIR.0000028818.33488.7B.
191. Sawicki G, Leon H, Sawicka J, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: A new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation*. 2005;112(4):544-552. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.531616.
192. Sung MM, Schulz CG, Wang W, Sawicki G, Bautista-López NL, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 degrades the cytoskeletal protein  $\alpha$ -actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(4):429-436. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.07.055.
193. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J*. 2004;18(6):690-692. doi:10.1096/fj.02-1202fje.
194. Chow AK, Cena J, El-Yazbi AF, et al. Caveolin-1 inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(4):896-901. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.01.008.
195. Hughes BG, Schulz R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(4). doi:10.1007/s00395-014-0424-y.
196. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000;101(15):1833-1839. doi:10.1161/01.CIR.101.15.1833.
197. Tiwari M, Hemalatha T, Ganesan K, et al. Myocardial ischemia and reperfusion injury in rats: Lysosomal hydrolases and matrix metalloproteinases mediated cellular damage. *Mol Cell Biochem*. 2008;312(1-2):81-91. doi:10.1007/s11010-008-9723-7.
198. Cadete VJJ, Arcand SA, Chaharyn BM, et al. Matrix metalloproteinase-2 is activated during ischemia/reperfusion in a model of myocardial infarction. *Can J Cardiol*. 2013;29(11):1495-1503. doi:10.1016/j.cjca.2013.03.014.
199. Qun Gao C, Sawicki G, Suarez-Pinzon WL, et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2003;57(2):426-433. doi:10.1016/S0008-6363(02)00719-8.

200. Ali MAM, Cho WJ, Hudson B, Kassiri Z, Granzier H, Schulz R. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: Implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;122(20):2039-2047. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222.
201. Lalu MM, Csonka C, Giricz Z, Csont T, Schulz R, Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296(4):937-941. doi:10.1016/S0006-291X(02)02019-3.
202. Schulze CJ, Wang W, Suarez-Pinzon WL, Sawicka J, Sawicki G, Schulz R. Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003;107(19):2487-2492. doi:10.1161/01.CIR.0000065603.09430.58.
203. Takawale A, Fan D, Basu R, et al. Myocardial recovery from ischemia-reperfusion is compromised in the absence of tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Circ Hear Fail*. 2014;7(4):652-662. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001113.
204. Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W, et al. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction. Results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(1):15-20. doi:10.1016/j.jacc.2006.02.055.
205. Horowitz JD, Chong CR. Matrix metalloproteinase-2 activation: Critical to myocardial contractile dysfunction following ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2020;116(5):876-878. doi:10.1093/cvr/cvz271.
206. Skrzypiec-Spring M, Urbaniak J, Sapa-Wojciechowska A, et al. Matrix metalloproteinase-2 inhibition in acute ischemia-reperfusion heart injury—cardioprotective properties of carvedilol. *Pharmaceuticals*. 2021;14(12). doi:10.3390/ph14121276.
207. Bil-Lula I. A drug cocktail for protecting against ischemia-reperfusion injury. *Front Biosci*. 2020;25(4):4831. doi:10.2741/4831.
208. Bencsik P, Kupai K, Giricz Z, et al. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2010;299(2). doi:10.1152/ajpheart.00052.2010.
209. Donato M, D'Annunzio V, Buchholz B, et al. Role of matrix metalloproteinase-2 in the cardioprotective effect of ischaemic postconditioning: Experimental Physiology-Research Paper. *Exp Physiol*. 2010;95(2):274-281. doi:10.1113/expphysiol.2009.049874.
210. Vandecaetsbeek I, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *BioFactors*. 2009;35(6):484-499. doi:10.1002/biof.63.

211. Talukder MAH, Yang F, Nishijima Y, et al. Reduced SERCA2a converts sub-lethal myocardial injury to infarction and affects postischemic functional recovery. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(2):285-287. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.10.026.
212. Roczkowsky A, Chan BYH, Lee TYT, et al. Myocardial MMP-2 contributes to SERCA2a proteolysis during cardiac ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2020;116(5):1021-1031. doi:10.1093/cvr/cvz207.
213. Chan BYH, Roczkowsky A, Cho WJ, et al. Junctophilin-2 is a target of matrix metalloproteinase-2 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2019;114(6). doi:10.1007/s00395-019-0749-7.
214. Chen J, Tung CH, Allport JR, Chen S, Weissleder R, Huang PL. Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. *Circulation.* 2005;111(14):1800-1805. doi:10.1161/01.CIR.0000160936.91849.9F.
215. Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, et al. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J.* 2005;26(1):27-35. doi:10.1093/eurheartj/ehi007.
216. Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 1999;99(23):3063-3070. doi:10.1161/01.CIR.99.23.3063.
217. Romanic AM, Harrison SM, Bao W, et al. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res.* 2002;54(3):549-558. doi:10.1016/S0008-6363(02)00254-7.
218. Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2006;290(1). doi:10.1152/ajpheart.00457.2005.
219. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2000;106(1):55-62. doi:10.1172/JCI8768.
220. Lan H, Su Y, Liu Y, et al. Melatonin protects circulatory death heart from ischemia/reperfusion injury via the JAK2/STAT3 signalling pathway. *Life Sci.* 2019;228(February):35-46. doi:10.1016/j.lfs.2019.04.057.
221. Domínguez-Rodríguez A, Hernández-Vaquero D, Abreu-González P, et al. Early treatment of acute myocardial infarction with melatonin: effects on MMP-9 and adverse cardiac events. *J Clin Med.* 2022;11(7):1-8. doi:10.3390/jcm11071909.
222. Timmis A, Vardas P, Townsend N, et al. European society of cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: executive summary. *Eur Hear J - Qual Care Clin Outcomes.* 2022;8(4):377-382. doi:10.1093/ehjqcco/qcac014.

223. Gragnano F, Mehran R, Branca M, et al. P2Y12 inhibitor monotherapy or dual antiplatelet therapy after complex percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2023;81(6):537-552. doi:10.1016/j.jacc.2022.11.041.
224. Natsuaki M, Sonoda S, Yoshioka G, et al. Antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention: current status and future perspectives. *Cardiovasc Interv Ther*. 2022;37(2):255-263. doi:10.1007/s12928-022-00847-1.
225. Yang BC, Virmani R, Nichols WW, Mehta JL. Platelets protect against myocardial dysfunction and injury induced by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. *Circ Res*. 1993;72(6):1181-1190. doi:10.1161/01.RES.72.6.1181.
226. Russo I, Femminò S, Barale C, et al. Cardioprotective properties of human platelets are lost in uncontrolled diabetes mellitus: A study in isolated rat hearts. *Front Physiol*. 2018;9(JUL):1-15. doi:10.3389/fphys.2018.00875.
227. Watała C, Rywaniak J, Siewiera K, Kassassir H, Sychowski R, Łabieniec-Watała M. O niektórych niediagnostycznych zastosowaniach cytometrii przepływowej. *Cytom Pol*. 2012;1(1):20-73.
228. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al. PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989;59(2):305-312. doi:10.1016/0092-8674(89)90292-4.
229. Hayashi SI, Watanabe N, Nakazawa K, et al. Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 2000;102(14):1710-1717. doi:10.1161/01.CIR.102.14.1710.
230. Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, et al. Single injection of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2003;107(17):2244-2249. doi:10.1161/01.CIR.0000065604.56839.18.
231. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(9):1189-1205. doi:10.1007/PL00000933.
232. Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with hermansky-pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1775-1782. doi:10.1172/JCI116388.
233. Metzelaar MJ, Wijngaard PLJ, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen: A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem*. 1991;266(5):3239-3245. doi:10.1016/s0021-9258(18)49980-2.
234. Israels SJ, McMillan-Ward EM. CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Thromb Haemost*. 2005;93(2):311-318. doi:10.1160/TH04-08-0503.

235. Israels SJ, McMillan-Ward EM, Easton J, Robertson C, McNicol A. CD63 associates with the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):134-141. doi:10.1055/s-0037-1612916.
236. Shavadia JS, Granger CB, Alemayehu W, et al. Novel biomarkers, st-elevation resolution, and clinical outcomes following primary percutaneous coronary intervention. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(13). doi:10.1161/JAHA.120.016033.
237. Itoh T, Nakai K, Ono M, Hiramori K. Can the risk for acute cardiac events in acute coronary syndrome be indicated by platelet membrane activation marker P-selectin? *Coron Artery Dis.* 1995;6(8):645-650. doi:10.1097/00019501-199508000-00009.
238. Hartopo AB, Mayasari DS, Puspitawati I, Mumpuni H. Circulating platelet-derived microparticles associated with postdischarge major adverse cardiac events in ST-Elevation Acute Myocardial Infarction. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/6721584.
239. Wang H, Liu Z, Shao J, et al. Immune and inflammation in acute coronary syndrome: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Immunol Res.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/4904217.
240. Bergandi L, Cordero M, Anselmino M, et al. Altered nitric oxide/CGMP platelet signaling pathway in platelets from patients with acute coronary syndromes. *Clin Res Cardiol.* 2010;99(9):557-564. doi:10.1007/s00392-010-0157-3.
241. Varon D, Shai E. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *J Thromb Haemost.* 2015;13(S1):S40-S46. doi:10.1111/jth.12976.
242. Somodi L, Beke Debreceni I, Kis G, et al. Activation mechanism dependent surface exposure of cellular factor XIII on activated platelets and platelet microparticles. *J Thromb Haemost.* 2022;20(5):1223-1235. doi:10.1111/jth.15668.
243. Milioli M, Ibáñez-Vea M, Sidoli S, Palmisano G, Careri M, Larsen MR. Quantitative proteomics analysis of platelet-derived microparticles reveals distinct protein signatures when stimulated by different physiological agonists. *J Proteomics.* 2015;121:56-66. doi:10.1016/j.jprot.2015.03.013.
244. French SL, Butov KR, Allaeyes I, et al. Platelet-derived extracellular vesicles infiltrate and modify the bone marrow during inflammation. *Blood Adv.* 2020;4(13):3011-3023. doi:10.1182/bloodadvances.2020001758.
245. Sandberg H, Bode AP, Dombrose FA, Hoechli M, Lentz BR. Expression of coagulant activity in human platelets: Release of membranous vesicles providing platelet factor 1 and platelet factor 3. *Thromb Res.* 1985;39(1):63-79. doi:10.1016/0049-3848(85)90122-7.
246. Puhm F, Boilard E, MacHlus KR. Platelet extracellular vesicles; beyond the blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):87-96. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314644.

247. Morel O, Toti F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: Disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(12):2594-2604. doi:10.1161/01.ATV.0000246775.14471.26.
248. Satta N, Toti F, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome: an inherited defect of the procoagulant activity of platelets. *Platelets.* 1997;8(2-3):117-124. doi:10.1080/09537109709169326.
249. Tans G, Rosing J, Thomassen MCLGD, Heeb MJ, Zwaal RFA, Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood.* 1991;77(12):2641-2648. doi:10.1182/blood.v77.12.2641.bloodjournal77122641.
250. Berckmans RJ, Lacroix R, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles and coagulation in blood from healthy humans revisited. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1). doi:10.1080/20013078.2019.1688936.
251. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FPHTM, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001;85(4):639-646. doi:10.1055/s-0037-1615646.
252. Berckmans RJ, Lacroix R, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles and coagulation in blood from healthy humans revisited. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1). doi:10.1080/20013078.2019.1688936.
253. Trummer A, De Rop C, Tiede A, Ganser A, Eisert R. Isotype controls in phenotyping and quantification of microparticles: A major source of error and how to evade it. *Thromb Res.* 2008;122(5):691-700. doi:10.1016/j.thromres.2008.01.005.
254. Chandler WL. Measurement of microvesicle levels in human blood using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016;90(4):326-336. doi:10.1002/cyto.b.21343.
255. Utz J, Berner J, Muñoz LE, et al. Cerebrospinal fluid of patients with alzheimer's disease contains increased percentages of synaptophysin-bearing microvesicles. *Front Aging Neurosci.* 2021;13(July):1-8. doi:10.3389/fnagi.2021.682115.
256. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
257. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MAM, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 2010;85(3):413-423. doi:10.1093/cvr/cvp268.
258. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(12):4322-4326. doi:10.1073/pnas.83.12.4322.

259. Gu Z, Kaul M, Yan B, et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death. *Science*. 2002;297(5584):1186-1190. doi:10.1126/science.1073634.
260. Banaszkiwicz M, Olejnik A, Krzywonos-Zawadzka A, Hałucha K, Bil-Lula I. Expression of atrial-fetal light chains in cultured human cardiomyocytes after chemical ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2021;24(5). doi:10.3892/mmr.2021.12410.
261. Olejnik A, Krzywonos-Zawadzka A, Banaszkiwicz M, Bil-Lula I. Klotho protein decreases MMP-mediated degradation of contractile proteins during ischaemia/reperfusion injury to the cardiomyocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24). doi:10.3390/ijms232415450.
262. He J, Liu D, Zhao L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review). *Exp Ther Med*. 2022;23(6):1-11. doi:10.3892/etm.2022.11357.
263. Krzywonos-Zawadzka A, Franczak A, Olejnik A, et al. Cardioprotective effect of MMP-2-inhibitor-NO-donor hybrid against ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med*. 2019;23(4):2836-2848. doi:10.1111/jcmm.14191.
264. Dabek J, Glogowska-Ligus J, Szadorska B. Transcription activity of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinase genes and their tissue inhibitor (TIMP-2) in acute coronary syndrome patients. *J Postgrad Med*. 2013;59(2):115-120. doi:10.4103/0022-3859.113836.
265. Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res*. 2002;90(7):784-791. doi:10.1161/01.RES.0000015588.70132.DC.
266. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol*. 2003;4(9). doi:10.1186/gb-2003-4-9-117.
267. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell*. 2006;21(4):521-531. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.010.
268. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*. 2011;118(13):3680-3683. doi:10.1182/blood-2011-03-344408.
269. Nilsson RJA, Karachaliou N, Berenguer J, et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(1):1066-1075. doi:10.18632/ONCOTARGET.6279.
270. Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Platelets - An important element of the immune system. *Pol J Vet Sci*. 2013;16(2):407-413. doi:10.2478/pjvs-2013-0058.



271. Hałucha KJ, Banaszekiewicz M, Rak-Pasikowska A, Bil-Lula I. MMP-2 inhibition prevents platelet activation in ischemia/reoxygenation conditions. *Adv Clin Exp Med*. 2022;31(12):1375-1384. doi:10.17219/acem/152286.
272. Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J*. 2001;141(2):211-217. doi:10.1067/mhj.2001.112238.
273. Lahdentausta L, Leskelä J, Winkelmann A, et al. Serum MMP-9 Diagnostics, Prognostics, and Activation in Acute Coronary Syndrome and Its Recurrence. *J Cardiovasc Transl Res*. 2018;11(3):210-220. doi:10.1007/s12265-018-9789-x.
274. Chen J min, James C, Ugo V, Coue L. To the editor : Differential expression of MMP-2 and MMP-9 activity in megakaryocytes and platelets Response MMP-9 in platelets : maybe , maybe not. 2012;118(24):6470-6471.
275. Cameron SJ, Ture SK, Mickelsen D, et al. Platelet extracellular regulated protein kinase 5 is a redox switch and triggers maladaptive platelet responses and myocardial infarct expansion. *Circulation*. 2015;132(1):47-58. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015656.
276. Wagner DR, Delagardelle C, Ernens I, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail*. 2006;12(1):66-72. doi:10.1016/j.cardfail.2005.08.002.
277. Zhang N, Aiyasiding X, Li W jing, Liao H han, Tang Q zhu. Neutrophil degranulation and myocardial infarction. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):1-23. doi:10.1186/s12964-022-00824-4.
278. Yan Y, Zhang J, Zhang Q, Chen Y, Zhu X, Xia R. The role of microRNAs in platelet biology during storage. *Transfus Apher Sci*. 2017;56(2):147-150. doi:10.1016/j.transci.2016.10.010.
279. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):465-468. doi:10.1101/pdb.prot095497.
280. Bil-Lula I, Krzywonos-Zawadzka A, Sawicka J, et al. L-NAME improves doxycycline and ML-7 cardioprotection from oxidative stress. *Front Biosci - Landmark*. 2018;23(2):298-309. doi:10.2741/4592.
281. Biały D, Wawrzyńska M, Bil-Lula I, et al. Low frequency electromagnetic field decreases ischemia-reperfusion injury of human cardiomyocytes and supports their metabolic function. *Exp Biol Med*. 2018;243(10):809-816. doi:10.1177/1535370218779773.
282. Stowe DF, Camara AKS. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: Modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(6):1373-1414. doi:10.1089/ars.2008.2331.

283. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):660-666. doi:10.1038/sj.cdd.4402307.
284. Al-Samkari H, Kuter DJ. Lactate dehydrogenase is elevated in immune thrombocytopenia and inversely correlates with platelet count. *Br J Haematol.* 2019;187(3):e61-e64. doi:10.1111/bjh.16183.
285. Gulliksson H. Adenylate kinase as a marker for platelet lysis. *Transfusion.* 1990;30(6):536-540. doi:10.1046/j.1537-2995.1990.30690333486.x.
286. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):402-413. doi:10.1016/j.cardiores.2003.09.019.
287. Krzywonos-Zawadzka A, Franczak A, Sawicki G, Bil-Lula I. Mixture of MMP-2, MLC, and NOS inhibitors affects NO metabolism and protects heart from cardiac I/R injury. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020. doi:10.1155/2020/1561478.
288. Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(5):292-316. doi:10.1038/nrcardio.2017.224.
289. Davidson SM, Andreadou I, Barile L, et al. Circulating blood cells and extracellular vesicles in acute cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2019;115(7):1156-1166. doi:10.1093/cvr/cvy314.
290. Leary PJ, Rajasekaran S, Morrison RR, Tuomanen EI, Chin TK, Hofmann PA. A cardioprotective role for platelet-activating factor through NOS-dependent S-nitrosylation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2008;294(6):1-22. doi:10.1152/ajpheart.00269.2008.

## SUPPLEMENT

## ŻYCIORYS NAUKOWY

### Dane osobowe

Imię i nazwisko: Kornela Hałucha  
Telefon: 71 784 06 27  
e-mail: k.halucha@umw.edu.pl

### Doświadczenie zawodowe

od października 2023 asystent w Zakładzie Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej Katedry Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

od lipca 2018 młodszy asystent w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii we Wrocławiu

maj – lipiec 2018 pomoc laboratoryjna w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii we Wrocławiu

sierpień – grudzień 2017 pomoc laboratoryjna w NZOZ DIALAB Laboratoria Medyczne

luty – czerwiec 2017 wolontariat w Centralnym Laboratorium Analitycznym Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu

### Wykształcenie

Od października 2018 studia doktoranckie w Zakładzie Chemii Klinicznej i Hematologii Laboratoryjnej Katedry Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

2013 – 2018 studia magisterskie, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, kierunek: analityka medyczna

2010 – 2013 szkoła średnia, II Liceum Ogólnokształcące im. Hugona Kołłątaja w Wałbrzychu, profil: biologiczno-chemiczny

### Opublikowane prace

1. Hałucha Kornela, Rak-Pasikowska Alina, Bil-Lula Iwona: Protective role of platelets in myocardial infarction and ischemia/reperfusion injury, *Cardiology Research and Practice*, 2021, vol. 2021, art.5545416 [14 s.]. DOI:10.1155/2021/5545416. IF: 1,99, MEiN: 100.

2. Banaszekiewicz Marta, Olejnik Agnieszka, Krzywonos-Zawadzka Anna, Kornela Hałucha, Iwona Bil-Lula: Expression of atrial-fetal light chains in cultured human cardiomyocytes after chemical ischemia-reperfusion injury, *Molecular Medicine Reports*, 2021, vol. 24, nr 5, art.770 [10 s.]. DOI:10.3892/mmr.2021.12410. IF: 3,423, MEiN: 70.
3. Hałucha Kornela, Banaszekiewicz Marta, Rak-Pasikowska Alina, Bil-Lula Iwona: MMP-2 inhibition prevents platelet activation in ischemia/reoxygenation conditions, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2022, vol. 31, nr 12, s.1375-1384. DOI:10.17219/acem/152286. IF: 2,1, MEiN: 70.
4. Rak-Pasikowska Alina, Hałucha Kornela, Sapa-Wojciechowska Agnieszka, Wrzyszc Aneta, Gałuszka Wioletta, Pęcka-Solińska Anna, Bil-Lula Iwona: The effect of leukocyte removal and matrix metalloproteinase inhibition on platelet storage lesions, *Cells*, 2024, vol. 13, nr 6, s.art.506 [19]. DOI:10.3390/cells13060506. IF: 6,0, MEiN:140.
5. Bil-Lula Iwona, Kuliczkowski Wiktor, Krzywonos-Zawadzka Anna, Frydrychowski Piotr, Stygar Dominika, Hałucha Kornela, Noszczyk-Nowak Agnieszka: Mixture of doxycycline, ML-7 and L-NAME restores the pro- and antioxidant balance during myocardial infarction—in vivo pig model study, *Biomedicines*, 2024, vol. 12, nr 4, art.784 [19 s.]. DOI:10.3390/biomedicines12040784. IF: 4,7, MEiN: 100.

### **Doniesienia zjazdowe i wygłoszone referaty**

1. Tłokińska Paulina, Waloszczyk Monika, Wiśniewska Kornela: Wady i zalety testów skriningowych na obecność narkotyków. Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 18 listopada 2014 r. Książka abstraktów, 2014, s.46
2. Zok Marta, Wiśniewska Kornela: The deadly, jatrogenic intoxication by the kitchen salt. VI International Students' Conference of Young Medical Researchers. Wrocław, 31.03-02.04.2016. Book of abstracts, 2016, Wrocław, Studenckie Towarzystwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, s.52 poz.97, ISBN 978-83-942024-2-2
3. Zok Marta, Szczepaniak Nadia, Wiśniewska Kornela: Rola wybranych związków pochodzenia naturalnego w zmniejszaniu ryzyka wystąpienia nowotworów. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego w farmacji i medycynie". Wrocław, 20 maja 2016 r. Książka abstraktów, 2016, s.35
4. Wiśniewska Kornela, Szczepaniak Nadia, Zok Marta: Zastosowanie roślin transgenicznych w produkcji biofarmaceutyków. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego w farmacji i medycynie". Wrocław, 20 maja 2016 r. Książka abstraktów, 2016, s.24

5. Szczepaniak Nadia, Wiśniewska Kornela, Zok Marta: Konopie siewne - przyszłość medycyny. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie substancji pochodzenia naturalnego w farmacji i medycynie". Wrocław, 20 maja 2016 r. Książka abstraktów, 2016, s.9
6. Wiśniewska Kornela, Szczepaniak Nadia: Wpływ ftalanu butylobenzylu, bisfenolu A i ftalanu dibutyli na rozrodczość mężczyzn. Konferencja Naukowa "Wpływ związków toksycznych na zdrowie ludzi i zwierząt". Wrocław, 30.03.2017 r. Książka abstraktów, 2017, s.25 poz.1
7. Rak Alina, Sapa Agnieszka, Wiśniewska Kornela [i in.]: Metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-9 jako marker starzenia się płytek krwi, *Diagnostyka Laboratoryjna*, 2017, vol. 53, nr suppl.1, s.87 poz.P-80. XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej. Kraków, 3-6 września 2017 r. Streszczenia.
8. Wiśniewska Kornela, Tanistra Ewelina, Nahaczewska Wiesława [i in.]: Wpływ czasu i warunków przechowywania krwi pobranej na EDTA na interpretację wyniku oceny rozmazu krwi obwodowej, W: XXXVII Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Diagnostów Laboratoryjnych Wojska Polskiego i X Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa PTDL Oddział Wrocław połączona z obchodami Dnia Diagnostyki Laboratoryjnej "Diagnostyka laboratoryjna istotnym elementem w opiece nad pacjentem". Szklarska Poręba, 24-25 maja 2018 r. Streszczenia, 2018, s.24-25 poz.P15
9. Wiśniewska Kornela: Wpływ czasu i warunków przechowywania krwi pobranej na sole kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) na morfologię płytek krwi. *Interdyscyplinarność przyszłości nauki*. Zieloniec, 12-14 kwietnia 2019. Księga abstraktów, 2019, s.24
10. Wiśniewska Kornela, Rak-Pasikowska Alina, Wrzyszc Aneta [i in.]: Changes in platelet aggregation during storage, W: National Scientific Conference "Science Research and Development" - III edition. Warsaw, October 26, 2019. The book of abstracts, 2019, Łódź, Promovendi Foundation Publishing, s.20, ISBN 978-83-955366-1-8
11. Rak-Pasikowska Alina, Wiśniewska Kornela, Wrzyszc Aneta: Platelet aggregation and expression of platelet activation markers in non-filtered and leukocyte-depleted platelet concentrates - preliminary research EuroMedLab 2019: 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinica Chimica Acta*, 2019, vol. 493, nr suppl.1, s.S400 poz.W078. DOI:10.1016/j.cca.2019.03.853
12. Rak-Pasikowska Alina, Wrzyszc Aneta, Wiśniewska Kornela [i in.]: Impact of doxycycline on platelet activation during platelet concentrates storage - preliminary research. EuroMedLab 2019: 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinica Chimica Acta*, 2019, vol. 493, nr suppl.1, s.S380-S381 poz.W037. DOI:10.1016/j.cca.2019.03.812
13. Wiśniewska Kornela, Rak-Pasikowska Alina, Wrzyszc Aneta [i in.]: Activation of blood platelets in chemical ischemia and reperfusion conditions - preliminary research, W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October

2020 / Kulbacka Julita, Rembiałkowska Nina, Weźgowiec Joanna (red.), 2020, Wrocław, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.262-263, ISBN 978-83-66489-37-0

14. Hałucha Kornela, Wrzyszczyk Aneta, Rak-Pasikowska Alina [i in.]: Ochronny wpływ doksycykliny na płytki krwi w chemicznym niedokrwieniu i reperfuzji in vitro - badania wstępne, W: XIII Konferencja Naukowa Sekcji Prewencji i Epidemiologii PTK "Kardiologia Prewencyjna - wytyczne, wątpliwości, gorące tematy". 18-21 listopada 2020 [online]. Program konferencji, 2020, s.64 poz.P08
15. Rak-Pasikowska Alina, Hałucha Kornela, Kunachowicz Dominika [i in.]: Zmiany aktywności żelatynazy B w czasie przechowywania koncentratów krwinek płytkowych - badania wstępne, W: II. WSML - Wrocławskie Spotkanie Medycyny Laboratoryjnej. Wrocław, 26 marca 2021. Program konferencji i książka abstraktów, 2021, s.28 poz.P18
16. Hałucha Kornela, Rak-Pasikowska Alina, Wrzyszczyk Aneta [i in.]: Zmiany w aktywności MMP-2 płytek krwi w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji - badania wstępne, W: II. WSML - Wrocławskie Spotkanie Medycyny Laboratoryjnej. Wrocław, 26 marca 2021. Program konferencji i książka abstraktów, 2021, s.31 poz.P21
17. Hałucha Kornela, Olejnik Agnieszka, Bil-Lula Iwona: Ochronny wpływ płytek krwi na metabolizm kardiomiocytów w warunkach chemicznego niedokrwienia i reperfuzji, *Folia Medica Cracoviensia*, 2021, vol. 61, nr suppl.1, s.24
18. Bil-Lula Iwona, Noszczyk-Nowak Agnieszka, Kuliczkowski Wiktor [i in.]: Nowa celowana strategia terapeutyczna uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego-analiza stresu oksydacyjnego na modelu świńskim in vivo, W: XV Kardiologia Prewencyjna. Kraków, 18-19 Listopada 2022. Program konferencji, 2022, s.90 poz.P16

### **Udział w projektach**

2023	Wykonawca projektu konkursowego w ramach subwencji „Znaczenie metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie starzenia się płytek krwi w składnikach krwi przeznaczonych do transfuzji” SUBK.D010.23.005
2022	Wykonawca projektu w ramach subwencji 2022: „Stres oksydacyjny w przebiegu zespołu metabolicznego i innych chorób przewlekłych” SUBZ.D010.22.039
2020	Kierownik projektu badawczego dla młodych naukowców pt.: "Wpływ doksycykliny na płytki krwi w warunkach niedokrwienia chemicznego i reperfuzji wywołanych in vitro" nr SIMPLE STM.D010.20.130.