



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

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 zawale (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 uzyskano 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.

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.