

## Streszczenie

### Wprowadzenie

Płytki krwi to małe (ok. 2 mikrometry średnicy), bezjądrzaste elementy krwi, formowane przez fragmentację cytoplazmy megakariocytów a pełniące odpowiedzialną rolę w utrzymaniu naczyniowej hemostazy. Płytki chronią system naczyniowy przed nadmierną utratą krwi, w przypadku przerwania ciągłości naczynia, przez utworzenie czopu hemostatycznego.

W przypadku zaburzenia mechanizmów regulacyjnych przepływu krwi (endotelium/płytki krwi) przez system naczyniowy dochodzi do groźnego następstwa patologicznego w postaci zakrzepicy naczyniowej.

Nasz zespół od wielu lat zajmuje się endogennymi mechanizmami regulującymi czynność płytek krwi a szczególnie tlenkiem azotu (NO), który hamuje aktywację płytek jak i działaniami metaloproteinaz przestrzeni pozakomórkowej -2 i -9, które aktywują (MMP-2) lub hamują (MMP-9) agregację płytek.

Interesują nas też efekty działania na płytki nanocząstek, niezwykle małych cząstek materii (1-100 nm), które obdarzone są unikalnymi właściwościami technologicznymi, biologicznymi i farmakologicznymi.

### Cel pracy

Moja rozprawa doktorska miała dwa cele:

1. Identyfikacja ekspresji i zbadanie farmakologicznych efektów płytkowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs).
2. Zbadanie farmakologicznych efektów nanocząstek węgla na czynność płytek krwi.

### Materiały

Do badań użyto krew ludzką pobraną od zdrowych ochotników. Badanie czynności płytek *in vitro* przeprowadzałam w środowisku osocza bogatopłytkowego i w izolowanych płytkach krwi. Agregacja płytek krwi była wywoływana przy pomocy płytkowych agonistów jak również przez komórki nowotworowe pochodzące z hodowli mięsaka ludzkiego (fibrosarcoma HT-1080). Badania *in vivo* przeprowadzaliśmy używając szczurzego modelu zakrzepicy naczyniowej.

Do badań nad wpływem nanocząstek na płytki krwi użyto następujące nanocząstki węglowe: SRM1640 (standardowa mieszanina miejskiego pyłu węglowego), MCN (nanocząstki uzyskane w procesie spalania węgla), SWNT (jednościenne nanorurki), MWNT (wielościenne nanorurki) i nanocząstki C60 (C60CS).

### Metody

- A) Do pomiaru agregacji płytek *in vitro* używałam agregometrii świetlnej i luminescencyjnej,
- B) Badania struktury płytki krwi przeprowadzono przy użyciu mikroskopii kontrastowo-fazowej, immunofluorescencyjnej i elektronowej z użyciem immunozłota dla obrazowania kolokalizacji MMP-2, MMP-9 i TIMP-4,
- C) Do oznaczania ekspresji receptorów płytkowych wykorzystano cytometrię przepływową,

- D) Białka płytkowe identyfikowałam używając Western blot,
- E) Aktywność enzymatyczną MMP-2 i MMP-9 mierzyłam przy pomocy zymografii,
- F) Aktywność inhibitorów MMP oznaczałam używając odwróconej zymografii,
- G) Zakrzepicę naczyniową u szczura wywoływano przy pomocy zewnętrznej ekspozycji naczynia na chlorek żelaza a ilościowano mierząc przepływ krwi w tętnicy szyjnej przy użyciu metody ultrasonograficznej.

### **Uzyskane wyniki i ich znaczenie**

1. Moje badania wskazują, że szlak agregacji płytek krwi kontrolowany przez MMP-2 jest regulowany przez TIMP-4.
2. TIMP-4 w niestymulowanych płytkach krwi kolokalizuje z proMMP-2.
3. Aktywacja płytek krwi prowadzi do dysocjacji kompleksu proMMP-2/TIMP-4 i aktywacji proMMP-2 do MMP-2.
4. Mechanizm działania MMP-2 na agregację płytek prawdopodobnie zależy od aktywacji receptora GPIIb/IIIa.
5. Nanocząstki węgla takie jak SRM1640, MCN, SWNT, MWNT, ale nie C60CS mają zdolność do agregacji płytek krwi *in vitro* i potęgują zakrzepicę w naczyniach szczura *in vivo*.
6. Molekularne mechanizmy działania nanocząstek węgla na płytki krwi są związane z aktywacją receptorów płytkowych i mogą też być mediowane przez MMPs.
7. Aktywacja płytek krwi wywołana działaniem nanocząstek węgla podlega regulacji przez prostacyklinę i NO, które są silnie działającymi inhibitorami agregacji płytek.
8. Uzyskane wyniki mają następujące znaczenie: A) leki modulujące czynność układu MMP-2/TIMP-4 mogą mieć znaczenie w regulacji krzepnięcia krwi, B) nanocząstki węgla, zarówno te stworzone w procesach spalania węgla, jak i te uzyskane w procesie nanotechnologicznym mają zdolność do aktywacji płytek krwi. Zachodzi więc potrzeba zachowywania szczególnej ostrożności przy generacji nowych nanofarmaceutyków dla nanomedycyny jak i badania biokompatybilności nowopowstałych nanocząstek z układem krzepnięcia krwi.

## Abstract

### Introduction

Platelets are small (2 micrometer in size) anucleate blood elements that are formed by fragmentation of megakaryocytes. They play an important role in vascular haemostasis. Platelets protect the vascular system from accidental blood loss by forming haemostatic plugs.

However, when mechanisms regulating haemostasis by the platelet-endothelial cell system fail, the ensuing vascular thrombosis have serious pathological consequences.

Over the past years our group has studied endogenous mechanisms involved in platelet regulation focusing on nitric oxide (NO) and matrix metalloproteinases (MMPs), in particular MMP-2 and MMP-9 that stimulate or inhibit platelet aggregation, respectively.

We have been also interested in effects of nanoparticles on platelet function. These are tiny (1-100 nm in size) particles endowed with unique, technological, biological and pharmacological properties.

### Aims

There were two aims of my doctoral dissertation:

1. To identify the expression and pharmacological role of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in human platelets.
2. To study pharmacological effects of carbon nanoparticles on platelet function.

### Materials

Blood was collected from human volunteers. Platelet function was studied in platelet-rich plasma and washed platelets suspensions. Agonist-induced platelet aggregation, as well as platelet aggregation stimulated by cancer cells (HT-1080, fibrosarcoma) was measured. A rat model of vascular thrombosis was used for *in vivo* experiments.

For studies on carbon nanoparticles the following particles were used: SRM1640 (standard reference material of particulate matter), MCN (mean carbon nanoparticles), SWNT (singlewall nanotubes), MWNT (multiplewall nanotubes) and C60CS (C60 nanoparticles).

### Methods

- A) Light aggregometry with chemiluminescence was used to measure platelet aggregation *in vitro*,
- B) Platelet structure was studied using phase-contrast, immunofluorescence and electron transmission microscopy with immunogold double labelling for studying colocalization of MMP-2, MMP-9 and TIMP-4,
- C) Flow cytometry was used to study the expression of platelet receptors,
- D) The expression of platelet proteins was measured using Western blotting,
- E) The activity of MMP-2 and MMP-9 was measured using zymography,
- F) TIMPs were measured using reverse zymography,
- G) Rat vascular thrombosis was induced by ferric chloride and quantified by the measurement of carotid blood flow using ultrasonic probes.

## Results and significance

1. I have found that the MMP-2-dependent pathway of platelet aggregation is regulated by TIMP-4.
2. TIMP-4 colocalizes with proMMP-2 in resting platelets.
3. Platelet aggregation leads to dissociation of proMMP-2/TIMP-4 complex and activation of proMMP-2 to MMP-2.
4. A mechanism of platelet-activating effects of MMP-2 is likely to be mediated *via* activation of GPIIb/IIIa in platelets.
5. Carbon nanoparticles such as SRM1640, MCN, SWNT, MWNT, but not C60CS, have the ability to aggregate human platelets.
6. These nanoparticles also amplify ferric chloride-induced thrombosis in rat carotid arteries.
7. Molecular mechanisms responsible for carbon nanoparticle-induced aggregation appear to be mediated by activation of platelet receptors and may also be MMP-dependent.
8. Prostacyclin and NO, potent inhibitors of platelet aggregation, down regulate carbon nanoparticle-induced aggregation.
9. These results are of significance as they indicate that A) pharmaceuticals that modulate the function of the MMP-2/TIMP-4 system may be used for modulation of vascular thrombosis and B) carbon nanoparticles both derived from the combustion of fuel fossils, as well as nanoengineered, show the ability to aggregate platelets and stimulate vascular thrombosis. Therefore, care should be taken when designing new nanopharmaceuticals for nanomedicine and the biocompatibility of newly synthesized nanopharmaceuticals with the blood clotting system should be carefully evaluated.