



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Kamila Anna Czubak-Prowizor


**Mechanizmy niepożądanych reakcji
związanych z przetaczaniem
koncentratów krwinek czerwonych
w badaniach *in vitro* oraz *in vivo***

Mechanisms of red blood cell transfusion-related
adverse reactions - *in vitro* and *in vivo* studies

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej
Instytutu Biochemii

pod kierunkiem
dr hab. Haliny Małgorzaty Żbikowskiej, prof. UŁ

 Łódź, 2020

Podziękowania

*Pragnę podziękować tym wszystkim, bez pomocy i wsparcia których
niniejsza rozprawa doktorska nie mogłaby powstać*

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi
Pani Profesor Halinie Małgorzacie Żbikowskiej,
za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki, poświęcony czas,
wrozumiałość oraz umożliwienie wykonania pracy doktorskiej*

*Dziękuję Pracownikom i Doktorantom Katedry Biochemii Ogólnej
oraz Katedry Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego
za twórcze dyskusje, wymianę doświadczeń,
życzliwość i przyjazną atmosferę pracy*

*Dziękuję moim Bliskim, w szczególności Mężowi,
za cierpliwość, wrozumiałość,
pomoc w trudnych chwilach
i wsparcie, którym mnie obdarzyli*

*Niniejszą pracę dedykuję
moim Najbliższym*

Finansowanie

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z następujących źródeł:

1. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich pt. *„Reaktywność płytek krwi i komórek odpornościowych w obecności nadsączu (supernatantu) przechowywanych koncentratów krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji w badaniach in vitro”*.

Kod projektu: B1611000001146.02. 2016, kierownik.

2. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich pt. *„Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych i/lub koncentratu krwinek płytkowych u chorych na ostre białaczki szpikowe”*.

Kod projektu: B1711000001498.02. 2017, kierownik.

3. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich pt. *„Ocena właściwości pro-oksydacyjnych i pro-apoptotycznych przechowywanych krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji”*.

Kod projektu: B1811000001785.02. 2018, kierownik.



Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	8
CZEŚĆ TEORETYCZNA	
1. Wprowadzenie.....	15
2. Zmiany zachodzące w przechowywanych KKCz.....	17
2.1. Zmiany zachodzące w supernatantach przechowywanych KKCz.....	20
2.1.1. Hemoglobina, hem i żelazo	21
2.1.2. Mikropęcherzyki pochodzenia erytrocytarnego	24
2.1.3. Cytokiny	26
2.1.4. Bioaktywne lipidy	28
2.1.5. Białka	31
3. Transfuzja „świeże” vs. „stare” KKCz – aspekt kliniczny.....	34
3.1. Randomizowane badania kliniczne.....	34
4. KKCz w leczeniu niedokrwistości u pacjentów onkologicznych.....	38
4.1. Mediatory pro-nowotworowe i pro-zapalne w supernatantach KKCz.....	40
4.2. Wpływ przetoczenia KKCz na pacjentów onkologicznych.....	42
5. Stres oksydacyjny po przetoczeniu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców	45
5.1. Pacjenci oddziałów neonatologicznych	45
5.2. Pacjenci oddziałów intensywnej opieki medycznej (OIOM).....	47
5.3. Pacjenci po wielokrotnych transfuzjach	48
CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA	
6. Uzasadnienie podjęcia tematu.....	51
7. Założenia i cel badań.....	53
8. Materiały.....	55
8.1. Materiał badawczy	55
8.1.1. Koncentraty krwinek czerwonych (KKCz)	55
8.1.2. Charakterystyka linii komórkowych	57
8.1.3. Charakterystyka badanych grup pacjentów	60
8.2. Odczynniki chemiczne.....	63
8.3. Aparatura.....	64
9. Metody.....	66
9.1. Przygotowanie supernatantów	66
9.2. Oznaczanie poziomu wybranych parametrów w supernatantach KKCz (świeżych i przechowywanych).....	67
9.2.1. Oznaczanie stężenia pozakomórkowej (wolnej) hemoglobiny	67

9.2.2.	Pomiar stężenia hemu.....	67
9.2.3.	Pomiar stężenia żelaza (Fe^{2+} , Fe^{3+}).....	68
9.2.4.	Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego	69
9.2.5.	Oznaczanie populacji mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego metodą cytometrii przepływowej	69
9.2.6.	Wizualizacja procesu uwalniania EMPs za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej.....	70
9.2.7.	Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w układzie SDS-PAGE....	71
9.2.8.	Detekcja grup karbonylowych techniką Western blot.....	72
9.3.	Ocena parametrów czynnościowych płytek krwi po uprzedniej inkubacji z supernatantami pochodzącymi z KKCz	73
9.3.1.	Inkubacja z supernatantami	73
9.3.2.	Badanie adhezji płytek krwi do fibrynogenu i kolagenu typu I	73
9.3.3.	Pomiar agregacji płytek krwi	74
9.3.4.	Oznaczanie biologicznej aktywności płytek krwi	75
9.3.5.	Oznaczenia koagulometryczne.....	76
9.4.	Ocena działania supernatantów KKCz na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych.....	77
9.4.1.	Hodowla komórkowa	77
9.4.2.	Oznaczanie żywotności komórek	79
9.4.3.	Oznaczanie proliferacji komórek	80
9.4.4.	Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu RFT	81
9.4.5.	Oznaczanie uszkodzeń DNA komórek.....	82
9.4.6.	Oznaczanie aktywności kaspazy-3/7 w komórkach linii K-562	83
9.4.7.	Oznaczanie aktywności kaspazy-9 w komórkach linii K-562.....	84
9.5.	Oznaczanie wybranych markerów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu KKCz lub KKP w osoczu krwi chorych z AML.....	85
9.5.1.	Oznaczanie stężenia grup tiolowych	85
9.5.2.	Oznaczanie stężenia białka w reakcji z kwasem bincynchoniowym (BCA).....	86
9.5.3.	Oznaczanie zawartości grup karbonylowych	86
9.5.4.	Oznaczanie poziomu 3-nitrotyrozyny	88
9.5.5.	Oznaczanie zawartości końcowych produktów zaawansowanej glikacji.....	89
9.5.6.	Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów.....	90
9.5.7.	Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego	91
9.5.8.	Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej	91
9.5.9.	Oznaczanie aktywności transferazy glutationowej	92
9.5.10.	Oznaczanie zewnątrzkomórkowej aktywności dehydrogenazy mleczanowej metodą Wróblewskiego i La Due.....	93
9.6.	Analiza statystyczna.....	94

10. Wyniki	95
10.1. Charakterystyka supernatantów otrzymanych z przechowywanych i świeżych KKCz	95
10.1.1. Wybrane ilościowe parametry oceny supernatantów	95
10.1.2. Uwalnianie mikrocząstek erytrocytarnych	97
10.1.3. Rozdział elektroforetyczny białek	98
10.1.4. Detekcja grup karbonylowych.....	99
10.2. Ocena parametrów czynnościowych płytek krwi po uprzedniej inkubacji z supernatantami KKCz	100
10.2.1. Adhezja płytek krwi	100
10.2.2. Agregacja płytek krwi	101
10.2.3. Biologiczna aktywność płytek krwi	103
10.2.4. Oznaczenia koagulometryczne.....	108
10.3. Ocena działania supernatantów KKCz na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych	109
10.3.1. Linia K-562 – przewlekła białaczka szpikowa (CML)	109
10.3.2. Wybrane linie komórek nowotworowych wywodzących się z guzów litych.....	115
10.4. Ocena wybranych markerów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu KKCz lub KKP w osoczu krwi chorych z AML.....	121
10.4.1. Stężenie grup tiolowych	121
10.4.2. Zawartość grup karbonylowych	121
10.4.3. Poziom 3-nitrotyrozyny.....	122
10.4.4. Zawartość końcowych produktów zaawansowanej glikacji.....	123
10.4.5. Peroksydacja lipidów	123
10.4.6. Całkowity potencjał antyoksydacyjny.....	124
10.4.7. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej	125
10.4.8. Aktywność transferazy glutationowej	125
10.4.9. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej	126
10.5. Retrospektywna analiza niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaistniałych w WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w latach 2013-2016	127
10.5.1. Charakterystyka niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych	127
11. Dyskusja	132
12. Podsumowanie wyników	156
13. Wnioski	157
14. Streszczenie	158
15. Summary	160
16. Bibliografia	162
17. Spis tabel i rycin	178
18. Dorobek naukowy	183

Wykaz stosowanych skrótów

2,3-DPG	»	(ang. 2,3-Diphosphoglycerate); 2,3-difosfoglicerynian
3-NT	»	(ang. 3-Nitrotyrosine); 3-nitrotyrozyna
A2780	»	linia ludzkich komórek raka jajnika
AA	»	(ang. Arachidonic Acid); kwas arachidonowy
ABC PICU	»	(ang. Age of Blood in Children in Pediatric Intensive Care Unit)
ABLE	»	(ang. Age of Blood Evaluation)
ABTS	»	(ang. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
ACD	»	(ang. Acid-Citrate-Dextrose); antykoagulant kwas cytrynowy-cytrynian-glukoza
ADP	»	(ang. Adenosine Diphosphate); adozynodifosforan
Agaroz LMP	»	(ang. Low Melting Point Agarose) agaroz o niskim punkcie topnienia
Agaroz NMP	»	(ang. Normal Melting Point Agarose) agaroz o normalnym punkcie topnienia
AGE	»	(ang. Advanced Glycation End Products); końcowe produkty zaawansowanej glikacji
AI	»	(ang. Anaemia of Inflammation); niedokrwistość zapalna
AML	»	(ang. Acute Myeloid Leukemia); ostra białaczka szpikowa
APTT	»	(ang. Activated Partial Thromboplastin Time); czas kaolinowo-kefalinowy osocza
ARIPI	»	(ang. Age of Red Blood Cells In Premature Infants)
AS	»	(ang. Additive Solution); płyn uzupełniający/wzbogacający
ATP	»	(ang. Adenosine Triphosphate); adozynotrifosforan
BAL	»	(ang. Bronchoalveolar Lavage); popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
BCA	»	(ang. Bicinchoninic Acid); kwas bicynchoninowy
bFGF	»	(ang. basic Fibroblast Growth Factor); podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów
BPE	»	(ang. Bovine Pituitary Extract); ekstrakt z przysadki mózgowej bydłej
BrdU	»	(ang. 5-Bromo-2'-deoxyuridine); 5-bromo-2'-deoksyurydyna, analogu pirymidyny
BSA	»	(ang. Bovine Serum Albumin); albumina surowicy bydłej
CAT	»	(ang. Catalase); katalaza
CD	»	(ang. Conjugated Diene); sprzężone dieny
CDNB	»	(ang. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene); 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
cisPt	»	(ang. cisplatin); cisplatyna
CLD	»	(ang. Chronic Lung Disease); przewlekła choroba płuc
CML	»	(ang. Chronic Myeloid Leukemia); przewlekła białaczka szpikowa
CO	»	(ang. Carbon monoxide); tlenek węgla
COX	»	(ang. Cyclooxygenase); cyklooksigenaza

CPA	»	(ang. TAC; Total Antioxidant Capacity); Całkowity Potencjał Antyoksydacyjny
CPD	»	(ang. Citrate-Phosphate-Dextrose); antykoagulant cytrynian-fosforan-glukoza
CPDA	»	(ang. Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine); antykoagulant cytrynian-fosforan-glukoza-adenina
CRA	»	(ang. Cancer Related Anaemia); niedokrwistość towarzysząca nowotworom
CRP	»	(ang. C-Reactive Protein); białko C-reaktywne
Cys	»	(ang. cysteine); cysteina
DAMP(s)	»	(ang. Damage-Associated Molecular Patterns); struktury molekularne związane z uszkodzeniem
DAPI	»	(ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride); dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu
DCF	»	(ang. 2',7'-dichlorofluorescein); 2',7'-dichlorofluoresceina
DEHP	»	(ang. di-2-ethylhexyl phthalate); ftalan di-2-etyloheksylu
DHA	»	(ang. Docosahexaenoic Acid); kwas dokozaheksaenowy
DMEM	»	(ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium); podłoże wzrostowe DMEM
DMEM:F12	»	(ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F12); podłoże wzrostowe DMEM:F12
DMSO	»	(ang. Dimethylsulfoxide); dimetylosulfotlenek
DNPH	»	(ang. 2,4-Dinitrophenylhydrazine); 2,4-dinitrofenylohydrazyna
DPBS	»	(ang. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
DTNB	»	(ang. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy
ECOG	»	(ang. Eastern Cooperative Oncology Group); skala sprawności określająca stan ogólny pacjenta z chorobą nowotworową
EDTA	»	(ang. Ethylenediaminetetraacetic acid); kwas etylenodiaminotetraoctowy
EGF	»	(ang. Epidermal Growth Factor); naskórkowy czynnik wzrostu
EMP(s)	»	(ang. Erythrocyte-derived Microparticles); mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego
EMV(s)	»	(ang. Erythrocyte-derived Microvesicles); mikropęcherzyki pochodzenia erytrocytarnego
ENA	»	(ang. Neutrophil-Activating Protein); białko aktywujące neutrofile
FBS	»	(ang. Fetal Bovine Serum); bydlęca surowica płodowa
FFP	»	(ang. Fresh Frozen Plasma); świeżo mrożone osocze
free Hb	»	pozakomórkowa (wolna) hemoglobina
FSC	»	(ang. Forward Scatter Channel); przedni detektor światła rozproszonego
GP	»	(ang. Glycoprotein); glikoproteina
GP IIb/IIIa	»	(ang. Glycoprotein IIb/IIIa); glikoproteina IIb/IIIa
GPx	»	(ang. Glutathione Peroxidase); peroksydaza glutationowa

GRO	»	(ang. G rowth- R elated O ncogene); onkogen związany ze wzrostem
GSH	»	(ang. L-glutathione reduced); zredukowana postać glutationu
GST	»	(ang. G lutathione S -transferase); transferaza glutationowa
H₂DCF-DA	»	(ang. 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate); dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
Hb	»	(ang. H aemoglobin); hemoglobina
HBSS	»	(ang. H ank's B uffered S alt S olution); zbuforowany roztwór Hanks'a
HepG2	»	linia komórek ludzkiego raka wątrobowokomórkowego
HETE	»	kwasy hydroksyeikozatetraenowy
HLA	»	(ang. H uman L eucocyte A ntygen); antygen ludzkich leukocytów
HO-1	»	(ang. H eme O xxygenase- 1); oksigenaza hemowa-1
HODE	»	kwasy hydroksyoktadekadienowy
Hp	»	(ang. H aptoglobin); haptoglobina
HRP	»	(ang. H orseradish P eroxidase); peroksydaza chrzanowa
IFN	»	(ang. I nterferon); interferon
IGF	»	(ang. I nsulin-like G rowth F actor); insulinopodobny czynnik wzrostu
IL	»	(ang. I nterleukin); interleukina
INFORM	»	(ang. I nforming F resh versus O ld R ed cell M anagement)
INR	»	znormalizowany czas protrombinowy
K-562	»	linia ludzkich komórek przewlekłej białaczki szpikowej (CML)
KKCz	»	K oncentraty K rwinek C zerwonych
KKP	»	K oncentratu K rwinek P łytkowych
LA	»	(ang. L inoleic A cid); kwasy linolowy
LDH	»	(ang. L actate D ehydrogenase); dehydrogenaza mleczanowa
LO	»	(ang. L ipoxygenase); lipooksygenaza
LoVo	»	linia ludzkich komórek gruczolakoraka jelita grubego
LPS	»	(ang. L ipopolysaccharide); lipopolisacharyd
LR	»	(ang. L eukoreduced); leukoredukowany/filtrowany KKCz
Lyso-PC	»	(ang. L ysophosphatidylcholine); lizofosfatydylocholina
MAC	»	(ang. M embrane A ttack C omplexes); kompleksy atakujące błonę
MCF-10A	»	linia ludzkich komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego
MCF7	»	linia ludzkich komórek gruczolakoraka piersi
MCP	»	(ang. M onocyte C hemoattractant P rotein); białko chemotaktyczne monocytów
MDA	»	(ang. M alondialdehyde); dialdehyd malonowy
Met-Hb	»	(ang. M ethemoglobin); methemoglobina
MIF	»	(ang. M acrophage M igration I nhibitory F actor); czynnik hamujący migrację makrofagów

MIP	»	(ang. Macrophage Inflammatory Protein); białko makrofaga aktywowanego
MPO	»	(ang. myeloperoxidase); mieloperoksydaza, peroksydaza krwinek białych
MP(s)/MV(s)	»	(ang. Microparticles/Microvesicles); mikrocząstki/mikropęcherzyki
mtDNA	»	(ang. mitochondrial DNA); mitochondrialne DNA
NADH	»	(ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide); dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać zredukowana)
NF-κB	»	(ang. Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B
NLR	»	(ang. Non-leukoreduced); niefiltrowany KKCz
NLRP	»	podtyp receptora NOD-podobnego
NO	»	(ang. Nitric Oxide); tlenek azotu
NOX	»	(ang. NADPH oxidase); oksydaza NADPH
NTBI	»	(ang. Non-Transferrin Bound Iron); żelazo niezwiązane z transferyną
NUKKCz	»	Napromieniowany Ubogoleukocytarny Koncentrat Krwinek Czerwonych
NUKKP	»	Napromieniowany Ubogoleukocytarny Koncentrat Krwinek Płytkowych
OIOM	»	Oddział Intensywnej Opieki Medycznej
OS	»	(ang. Oxidative Stress); stres oksydacyjny
Pan02	»	linia mysich komórek raka trzustki
PAR(s)	»	(ang. Protease Activated Receptors); receptory aktywowane przez proteazy
PA(s)	»	(ang. Platelet Aggregates); agregaty płytkowe
PBS	»	(ang. Phosphate Buffered Saline); zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PC-3	»	linia ludzkich komórek gruczolakoraka prostaty
PDGF	»	(ang. Platelet-Derived Growth Factor); płytkopochodny czynnik wzrostu
PES	»	(ang. Polyethersulfone); membrana polieterosulfonowa
PGE2	»	(ang. Prostaglandin E2); prostagladyna E2
PGI2	»	(ang. Prostacyclin I2); prostacyklina I2
PLT(s)	»	(ang. Platelets); płytki krwi, trombocyty
PMP(s)	»	(ang. Platelet-derived Microparticles); mikropęcherzyki płytkowe
POCHP	»	(ang. COPD; Chronic Obstructive Pulmonary Disease); przewlekła obturacyjna choroba płuc
PPP	»	(ang. Platelet-Poor-Plasma); osocze ubogopłytkowe
PRP	»	(ang. Platelet-Rich-Plasma); osocze bogatopłytkowe
PRR(s)	»	(ang. Pattern Recognition Receptors); receptory rozpoznające wzorce
PS	»	(ang. Phosphatidylserine); fosfatydyloseryna
PT	»	(ang. Prothrombin Time); czas protrombinowy osocza
PUFA(s)	»	(ang. Polyunsaturated Fatty Acids); wielonienasycone kwasy tłuszczowe
PVC	»	(ang. Polyvinyl Chloride); polichlorek winylu

RAGE	»	(ang. R eceptor for A dvanced G lycation E nd- P roducts); receptor wiążący końcowe produkty zaawansowanej glikacji
RANTES	»	(ang. R egulated on A ctivation N ormal T -cell E xpressed and S ecreted); chemokina CCL5
RBC(s)	»	(ang. R ed B lood C ells); krwinki czerwone, erytrocyty
RCKiK	»	R egionalne C entrum K rwiodawstwa i K rwiolecznictwa
RCT(s)	»	(ang. R andomized C ontrolled T rials); randomizowane badania kontrolne
RECESS	»	(ang. R ed- C ell S torage D uration S tudy)
RFA	»	Reaktywne Formy Azotu
RFT	»	(ang. R OS; R eactive O xygen S pecies); Reaktywne Formy Tlenu
rhEGF	»	(ang. r ecombinant h uman E pidermal G rowth F actor); rekombinowany ludzki naskórkowy czynnik wzrostu
ROP	»	(ang. R etinopathy of P rematurity); retinopatia wcześniaków
RPMI	»	(ang. R oswell P ark M emorial I nstitute medium); medium wzrostowe RPMI
SAGM	»	(ang. S aline- A denine- G lucose- M annitol); roztwór wzbogacający/uzupełniający chlorek sodu-adenina-glukoza-mannitol
sCD40L	»	rozpuszczalny ligand CD40
SD	»	(ang. S tandard D eviation); odchylenie standardowe
SDF	»	(ang. S tromal cell- d erived F actor); zrębowy czynnik wzrostu
SDS	»	(ang. S odium D odecyl S ulfate); siarczan dodecyłu sodu
SEM	»	(ang. S tandard E rror of the M ean); błąd standardowy średniej
sLR1/42	»	supernatant otrzymany w 1./42. dniu z filtrowanych/ubogoleukocytarnych KKCz
sNLR1/42	»	supernatant otrzymany w 1./42. dniu z niefiltrowanych KKCz
SOD	»	(ang. S uperoxide D ismutase); dysmutaza ponadtlenkowa
SSC	»	(ang. S ide S catter C hannel); boczny detektor światła rozproszonego
TBA	»	(ang. T hiobarbituric A cid); kwas tiobarbiturowy
TBARS	»	(ang. T hiobarbituric A cid R eactive S ubstances); substancje reagujące z TBA
TCA	»	(ang. T richloroacetic A cid); kwas trichlorooctowy
TF	»	(ang. T issue F actor); czynnik tkankowy
TGF	»	(ang. T ransforming G rowth F actor); transformujący czynnik wzrostu
Th	»	(ang. L ymphocyte T helper); limfocyty T pomocnicze
TNB	»	anionu kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego
TNF	»	(ang. T umor N ecrosis F actor); czynnik martwicy nowotworu
tPA	»	(ang. t issue-type P lasminogen A ctivator); tkankowy aktywator plazminogenu
TRALI	»	(ang. T ransfusion R elated A cute L ung I njury); ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc

TRANSFUSE	»	(ang. ST anda Rd Issue TrAN sfusion versuS F resher Red-Cell Use in IntenSive CarE)
Treg	»	(ang. regulatory T cells); limfocyty T regulatorowe
TRIM	»	(ang. T ransfusion- R elated I mmunom o duction); immunomodulacja związana z przetoczeniem
TT	»	(ang. T hrombin T ime); czas trombinowy osocza
UKKCz	»	U bogoleukocytarny K oncentrat K rwinek C zerwonych
uPA	»	(ang. u rokinase-type P lasminogen A ctivator); urokinazowy aktywator plazminogenu
VEGF	»	(ang. V ascular E ndothelial G rowth F actor); czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
WHO	»	(ang. W orld H ealth O rganization); Światowa Organizacja Zdrowia
WWCOiT	»	W ojewódzkie W ielospecjalistyczne Centrum O nkologii i T raumatologii im. M. Kopernika w Łodzi
XO	»	(ang. X anthine O xidase); oksydaza ksantynowa

CZEŚĆ TEORETYCZNA

1. Wprowadzenie

Koncentraty krwinek czerwonych (KKCz) są najczęściej przetaczanym składnikiem krwi (na świecie według danych Światowej Organizacji Zdrowia ponad 85 milionów jednostek rocznie) [1-3]. W Polsce każdego roku w Regionalnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) otrzymuje się ponad milion jednostek KKCz, z których ok. 20-25% poddawanych jest procesowi usuwania leukocytów (UKKCz; ubogoleukocytarny KKCz) [4-14]. Dla porównania w Stanach Zjednoczonych aż 80% przetaczanych jednostek stanowi UKKCz [15].

KKCz przechowywane są do 42 dni w temperaturze $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ w roztworze wzbogacającym [16]. Przechowywanie jest konieczne, aby zapewnić odpowiednią ilość jednostek dla potrzeb służby zdrowia [17]. Podstawowym wskazaniem do stosowania KKCz jest niedokrwistość wynikająca z przebiegu różnych chorób lub powstała na skutek nagłej, dużej utraty krwi (ponad 30% objętości krwi krążącej). W sytuacji braku możliwości wprowadzenia leczenia alternatywnego, np. substytucja niedoborów, czy stosowanie środków pobudzających erytropoezę, pacjentowi z niedokrwistością podaje się KKCz w celu zapobiegania niedotlenieniu ważnych dla życia tkanek i narządów [18, 19]. Podczas rutynowego przechowywania *ex vivo* krwinki czerwone zachowują w pewnym stopniu aktywność metaboliczną, ale jednocześnie w tym środowisku nie ma fizjologicznych systemów, które usuwałyby, m.in. uszkodzone komórki oraz gromadzące się metabolity i mikropęcherzyki (w organizmie funkcje te pełnią, odpowiednio układ siateczkowo-śródbłonkowy oraz wątroba, nerki i komórki Kupffera w wątrobie) [17, 20]. Wraz z wydłużaniem czasu przechowywania erytrocyty narażone są na działanie coraz większych ilości produktów przemiany materii i komórkowych produktów degradacji, które uwalniane są do płynu uzupełniającego, co nie pozostaje bez znaczenia dla jakości tego składnika krwi [17]. Podstawowe pytania w dziedzinie transfuzjologii, na które aktualnie nie ma jednoznacznej odpowiedzi dotyczą kwestii czy długo przechowywane (pod koniec terminu przydatności) krwinki czerwone są tak samo skuteczne jak świeże oraz czy gromadzące się w płynie wzbogacającym przechowywanych KKCz substancje w bezpośredni sposób zwiększają ryzyko występowania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych u biorców? A jeśli tak, to czy zmniejszenie ilości leukocytów/płytek krwi w jednostce KKCz ma wpływ na częstość występowania tych reakcji.

Wyjaśnienie tych zagadnień stanowi duże wyzwanie dla transfuzjologów, przede

wszystkim z tego powodu, że leczenie koncentratem czerwonych krwinek stosowane jest w wielu jednostkach chorobowych i wiele różnych czynników, niezależnych od przetoczenia KKCz, może wpływać na zwiększoną chorobowość i śmiertelność biorców [17].

Określony maksymalny czas przechowywania KKCz w bankach krwi (42 dni) jest bezpośrednio związany z poziomem zmian (m.in. metabolicznych, oksydacyjnych) i uszkodzeń krwinek czerwonych w wyniku ich przechowywania w warunkach *ex vivo* [21]. Zmiany te prowadzą między innymi do wysycenia transferyny osoczowej, zmiatania tlenu azotu czy immunomodulacji, a w konsekwencji mogą być przyczyną występowania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych, tj. ostre uszkodzenie płuc czy nawet wyższej śmiertelności biorców [1]. Wyniki badań wielu grup badawczych potwierdzają, że stosowanie dłużej przechowywanych (ponad 14 dni) KKCz zwiększa ryzyko występowania reakcji poprzetoczeniowych [22-24], wciąż jednak dyskusyjną jest kwestia czy powinno się skrócić czas przechowywania tego składnika krwi i/lub wprowadzić obowiązek leukoredukcji. Wyniki randomizowanych badań kontrolnych (*ang. RCT; randomized controlled trials*) nie wykazały istotnego wpływu dłuższego przechowywania na zachorowalność czy śmiertelność biorców [18, 25-27] na oddziałach kardiochirurgii i intensywnej terapii [28-31], nadal pozostają jednak obawy dotyczące określonych grup pacjentów, tj. pacjenci po rozległych urazach czy wymagający masowych i/lub regularnych (przez całe życie) przetoczeń [32]. W związku z brakiem jednoznacznego stanowiska zagadnienie to pozostaje tematem aktualnych badań. Niezależnie od klinicznych skutków przetoczenia KKCz, przechowywanie komórek w warunkach *ex vivo* wpływa na wiele kluczowych parametrów [16]. Sugeruje się, że w ocenie jakości, skuteczności i bezpieczeństwa stosowania KKCz powinno oceniać się więcej parametrów, nie tylko czas przechowywania w banku krwi [1].

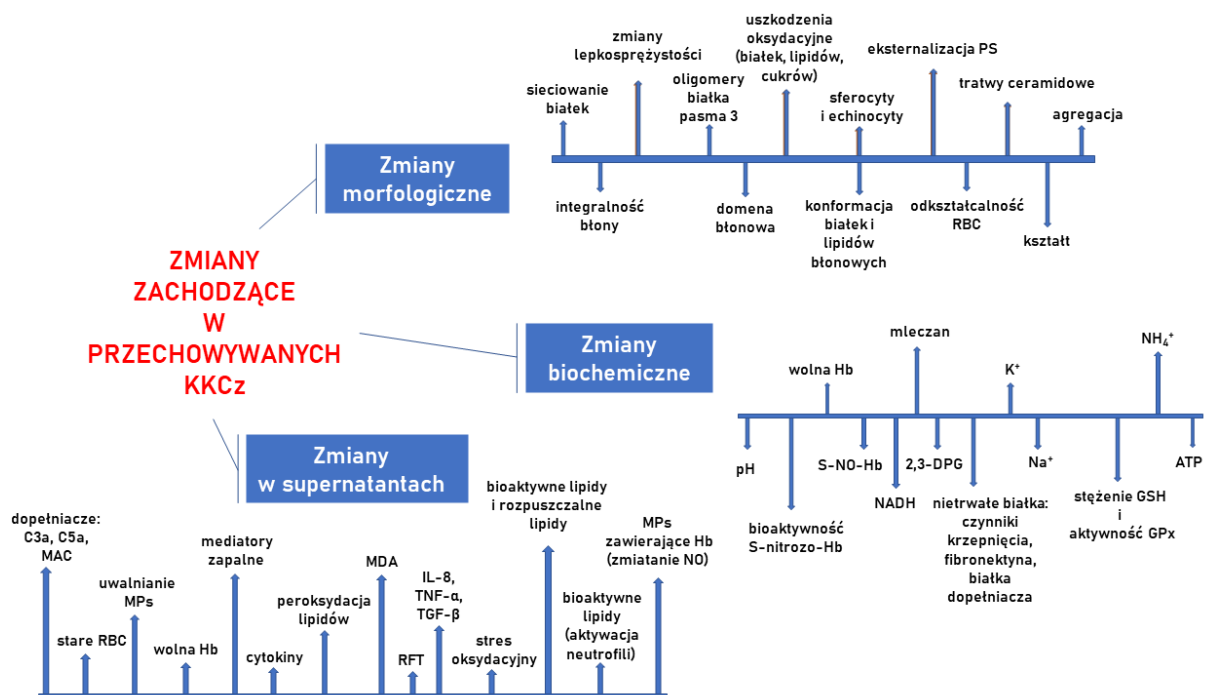
2. Zmiany zachodzące w przechowywanych KKCz

Pierwszy skuteczny płyn konserwujący (*ang. ACD; acid-citrate-dextrose*, w składzie kwas cytrynowy-cytrynian-glukoza), służący do przechowywania krwi pełnej przez okres do 21 dni, opracowano na początku lat 40. XX wieku. Wraz z upływem lat opracowywano nowe płyny konserwujące wydłużające okres przechowywania krwi pełnej, m.in. CPD (*ang. citrate-phosphate-dextrose*, w składzie cytrynian-fosforan-glukoza) do 21 dni, CPDA (*ang. citrate-phosphate-dextrose-adenine*, w składzie cytrynian-fosforan-glukoza-adenina) do 35 dni. Opracowano także płyny wzbogacające (uzupełniające), które umożliwiają przechowywanie preparatów czerwokrwinkowych do 42 dni (czas standardowo liczony jest od dnia pobrania krwi w RCKiK) w temperaturze $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, zapewniające żywotność krwinek w zakresie 75-89% (kryterium jakościowym jest przeżycie przez 24 godziny w organizmie biorcy minimum 75% przetoczonych krwinek czerwonych) oraz hemolizę na poziomie poniżej 0,8% pod koniec okresu magazynowania (zgodnie z obowiązującymi normami określonymi przez Radę Europy) [1, 2, 16, 33, 34]. Przeżywalność komórek po 24 godzinach od transfuzji mierzona jest *in vivo* po uprzednim znakowaniu krwinek izotopem ^{51}Cr [2, 16, 34]. Wprowadzenie płynów uzupełniających, umożliwiających przechowywanie erytrocytów do sześciu tygodni, było dużym osiągnięciem w transfuzjologii i umożliwiło opracowywanie skutecznych systemów gospodarki krwią i jej składnikami (w tzw. krajach zachodnich ok. 95% donacji KKCz znajduje biorców) [2].

W RCKiK preparat czerwokrwinkowy przeznaczony do transfuzji (o hematokrycie 65-75%) otrzymuje się z jednej jednostki krwi pełnej pobranej uprzednio na ACD lub CPD, a następnie po oddzieleniu poszczególnych składników krwi w procesie wirowania dodaniu odpowiedniego płynu uzupełniającego do frakcji erytrocytarnej [2]. W krajach europejskich krwinki czerwone przechowywane są w płynie wzbogacającym SAGM (*ang. Saline-Adenine-Glucose-Mannitol*, w składzie chlorek sodu-adenina-glukoza-mannitol), zaś na świecie najbardziej powszechne są roztwory AS-1 (Adsol[®]), AS-3 (Nutricel[®]) i AS-5 (Optisol[®]) [1, 2]. KKCz mogą być poddane procesowi filtracji przy użyciu filtrów antyleukocytarnych (leukoredukcji) w celu zmniejszenia narażenia biorcy na alloimmunizację antygenami HLA oraz zakażenie wirusem cytomegalii [1, 2, 35]. Tak przygotowany KKCz po podaniu biorcy powinien zwiększyć stężenie hemoglobiny o 1 g/dl oraz hematokryt o 3% [1].

Zmiany zachodzące w KKCz podczas przechowywania (*ang. storage lesion*) są związane ze starzeniem krwinek czerwonych w środowisku *ex vivo* i obejmują, m.in. hemolizę (wzrost stężenia pozakomórkowego wolnego żelaza, hemu, hemoglobiny),

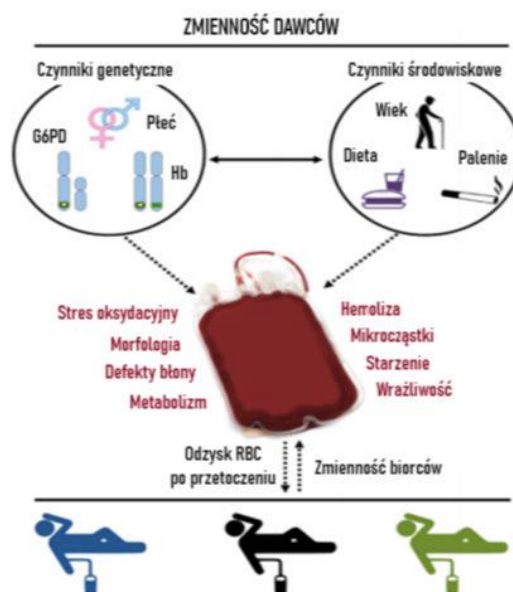
zmiany morfologiczne komórek (przede wszystkim wzrost odsetka sferocytów i echinocytów), oksydacyjne uszkodzenia białek, lipidów i węglowodanów, wzrost poziomu kwasu mlekowego oraz jonów potasu i wapnia, spadek stężenia 2,3-DPG i ATP, spadek pH i szybkości glikolizy czy akumulację uwalnianych z krwinek bioaktywnych białek, lipidów i mikrocząstek/mikropęcherzyków pochodzenia erythrocytarnego (*ang. erythrocyte-derived microparticles; EMPs, erythrocyte-derived microvesicles; EMVs*) [21, 34, 36-41]. Opisane dotychczas w obszernej literaturze zmiany zachodzące w przechowywanych KKCz podsumowuje Rycina 1.



Rycina 1. Zmiany zachodzące w przechowywanych KKCz. Strzałki powyżej linii bazowej reprezentują wzrost, a poniżej spadek zmiennej. Opracowanie własne na podstawie [39]. *Skróty: ATP (ang. adenosine triphosphate), adenozyntrofosforan; DPG (ang. diphosphoglycerate), difosfoglicerynian; Hb, hemoglobina; IL (ang. interleukin), interleukina; MAC (ang. membrane attack complexes), kompleksy atakujące błonę; MDA (ang. malondialdehyde), dialdehyd malonowy; MPs (ang. microparticles), mikrocząstki; NADH (ang. nicotinamide adenine dinucleotide), dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (postać zredukowana); NO (ang. nitric oxide), tlenku azotu; PS (ang. phosphatidylserine), fosfatydyloseryna; RBC (ang. red blood cel), krwinka czerwona; RFT, reaktywne formy tlenu; TGF (ang. transforming growth factor), transformujący czynnik wzrostu; TNF (ang. tumor necrosis factor), czynnik martwicy nowotworów.*

W ostatnio prowadzonych badaniach zaobserwowano istotny wzrost poziomu mitochondrialnego DNA (mtDNA) i mikrocząstek (MPs) zewnątrzkomórkowych w KKCz w zależności od sposobu przygotowania jednostki oraz w miarę upływu czasu przechowywania [42, 43]. Pomimo tego, iż znaczenie kliniczne tego odkrycia nie zostało poznane, zarówno mtDNA jak i MPs mogą mieć wpływ na bezpieczeństwo transfuzji, ponieważ należą do grupy struktur molekularnych związanych z uszkodzeniem (*ang. DAMPs; damage-associated molecular pattern*), które potencjalnie mogą aktywować układ

odpornościowy biorcy poprzez reakcję z receptorami rozpoznającymi wzorce (*ang. PRRs; pattern recognition receptors*) [42, 43]. Jedną z potencjalnych przyczyn występowania reakcji przetoczeniowych u biorców są gromadzące się w KKCz bioaktywne lipidy. Przeprowadzone badania metabolomiczne, polegające na oznaczeniu panelu bioaktywnych lipidów, zarówno w jednostkach KKCz poddanych leukoredukcji, jak i niefiltrowanych wykazało, iż filtracja istotnie zmniejszała produkcję tych związków. W 42. dniu przechowywania zaobserwowano jednak występowanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (*ang. PUFAs; polyunsaturated fatty acids*) i produktów ich utleniania (tj. oksylipin) niezależnie od tego czy jednostki KKCz były filtrowane czy nie [44].



Rycina 2. Zmienność dawców jako problem transfuzjologii. Opracowanie własne na podstawie [44-47].

W związku z faktem, że poziom większości parametrów służących do oceny zmian zachodzących podczas przechowywania KKCz rośnie wraz z czasem, w literaturze jednostki KKCz często dzieli się na „świeże” (≤ 21 dni przechowywania) oraz „stare” (>21 dni) [48, 49]. W innych badaniach jednostki KKCz już po 14 dniach przechowywania (>14 dni) są określane jako „stare” [50]. Założenie to spowodowało przyjęcie stanowiska, że KKCz przechowywane tyle samo dni charakteryzują się porównywalną jakością, co jak się później okazało nie jest prawdą, a „wiek” KKCz nie jest wystarczającym wskaźnikiem jakości przechowywanego składnika krwi [51, 52]. Zmienność genetyczna dawców, jak i czynniki nienetyczne, tj. dieta, wiek, styl życia [45, 47], wpływają na tempo występowania zmian w KKCz oraz odporność krwinek czerwonych na uszkodzenia wynikające z przechowywania w warunkach *ex vivo* (Rycina 2) [34, 45, 46, 52]. Na podstawie przeprowadzonych badań

wykazano, iż przeżywalność erytrocytów *in vivo* po przetoczeniu dłużej przechowywanych KKCz waha się w szerokim zakresie od 35% do 82% [33]. Do genetycznie uwarunkowanych czynników, wpływających na wytrzymałość krwinek czerwonych w warunkach przechowywania zaliczono, m.in. wewnątrzkomórkowy poziom glutationu w krwinkach [53, 54], predyspozycję do hemolizy *in vitro* [55] oraz występowanie rodzinnej pseudohiperkaliemii u dawców [47, 56]. Podsumowując, krwinki czerwone dawców, tak samo jak ludzie, starzeją się w różnym tempie, dlatego wprowadzone pojęcie „wiek metaboliczny” przechowywanych erytrocytów jest dużo dokładniejszym i bardziej istotnym klinicznie parametrem niż czas przechowywania jednostki KKCz. Jest nadzieja, że w przyszłości na bazie powyższych odkryć możliwe będzie opracowanie nowatorskich, spersonalizowanych strategii otrzymywania i przechowywania KKCz dostosowanych do zmienności dawców i biorców krwi [34, 45, 52].

Obecnie nadal trwają badania nad opracowaniem narzędzi przesiewowych pozwalających dokładniej określić w jakim stopniu krwinki czerwone od danego dawcy będą podatne na zmiany/uszkodzenia podczas przechowywania i w jakim tempie te zmiany będą zachodzić [39, 52, 55, 57, 58]. Prawidłowa interpretacja wyników przeprowadzonych dotychczas badań klinicznych będzie możliwa po uprzednim uwzględnieniu w nich zmienności międzyosobniczej dawców [39, 45, 55].

2.1. Zmiany zachodzące w supernatantach przechowywanych KKCz

Podczas przechowywania w supernatantach jednostek KKCz gromadzą się liczne biologicznie aktywne substancje, m.in. wolna hemoglobina (Hb), hem, żelazo, uszkodzone białka i lipidy, cytokiny; dochodzi także do uwalniania mikrocząstek [35, 47, 59-64]. W KKCz, które nie były poddane procesowi filtracji (leukoredukcji) obecne są, jako zanieczyszczenia, płytki krwi oraz krwinki białe (leukocyty) dawcy, które również uwalniają związki bioaktywne (m.in. cytokiny, mediatory wazoaktywne, enzymy proteolityczne) do supernatantu [65]. Istnieją dowody, że supernatanty pochodzące z przechowywanych ubogoleukocytarnych jednostek KKCz także nie są w pełni bezpieczne dla biorcy [65]. Wszystkie zgromadzone w supernatancie składniki wraz z krwinkami czerwonymi przetaczane są biorcom podczas transfuzji. Na podstawie badań *in vitro* dowiedziono, iż supernatanty pochodzące z dłużej przechowywanych KKCz wykazują właściwości prokoagulacyjne, zakrzepowe, immunomodulujące oraz zwężające naczynia krwionośne [63, 66-74], choć kliniczne znaczenie tych zjawisk nie jest dobrze poznane.

Badania na modelach zwierzęcych wykazały, iż uwalniane czynniki bioaktywne charakteryzują się potencjalnie toksycznym działaniem [41]. Do najdokładniej opisanych czynników należą:

- mikrocząstki, które mogą działać prokoagulacyjnie [69, 75-77] oraz wpływają na odporność wrodzoną i adaptacyjną oraz stan fizjologiczny organizmu [78],

- bioaktywne lipidy, które aktywują neutrofile i mogą przyczyniać się do występowania ostrego poprzetoczeniowego uszkodzenia płuc (*ang. TRALI; Transfusion Related Acute Lung Injury*) [79],

- cytokiny i chemokiny (zwłaszcza w jednostkach niefiltrowanych) [80],

- zmiatacze tlenu azotu (NO), tj. wolna hemoglobina oraz Hb występująca w mikrocząstkach, które mogą zaburzać relaksację naczyń krwionośnych [81],

- żelazo wolne i niezwiązane z transferyną, które może sprzyjać wzrostowi bakterii syderofilnych [41, 61, 82, 83].

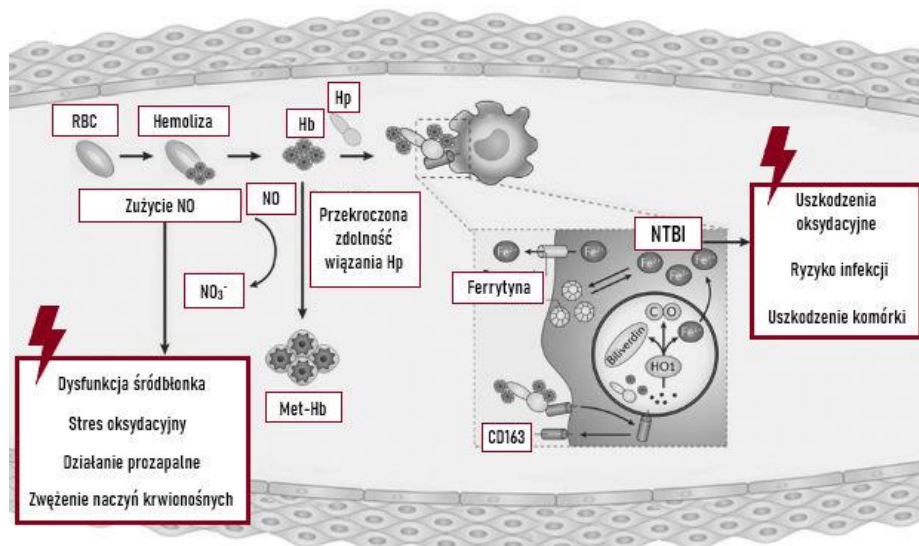
Na podstawie wyników badań *in vitro* możemy przewidywać z dużym prawdopodobieństwem, że przetoczone KKCz będą miały wpływ na biorców transfuzji *in vivo* [17, 62].

2.1.1. Hemoglobina, hem i żelazo

Występowanie hemolizy w przechowywanych KKCz jest jedną z najbardziej niepożądanych zmian zachodzących w tych jednostkach. Stopień hemolizy powszechnie uznawany jest jako miara jakości tego składnika krwi. Hemoglobina w supernatantach KKCz może być obecna w postaci wolnej w roztworze (Hb pozakomórkowa; *ang. free Hb*) lub tworzyć kompleksy z haptoglobiną, występuje także w mikropęcherzykach uwalnianych z erytrocytów [84]. Dotychczas nie określono jakie stężenie Hb w supernatancie KKCz jest szkodliwe dla biorcy, jednak wysoki stopień hemolizy zdefiniowany jako niedopuszczalny w jednostce (>1,0%) bezpośrednio związany jest z wysokim poziomem wolnej Hb (>500 mg/dl) [84].

Kliniczne skutki przetaczania KKCz, z końcowym terminem ważności, zawierających wyższe, w porównaniu ze „świeżym”, stężenie zewnątrzkomórkowej Hb nie są jednoznacznie określone. Sugeruje się, że pozakomórkowa Hb może być główną przyczyną lub jednym z czynników wpływających na występowanie wielu poprzetoczeniowych zdarzeń niepożądanych [85-87]. W jednym z ostatnich raportów Goel i wsp. [88] wykazali zwiększone ryzyko wystąpienia powikłań (częstsze występowanie zakrzepicy czy infekcji bakteryjnej) u biorców po przetoczeniu KKCz przechowywanych powyżej 35 dni. Obecne w supernatancie

wolna Hb, hem oraz żelazo są toksyczne dla wielu komórek i tkanek organizmu [89-91]. Postuluje się, iż Hb pozakomórkowa oraz obecna w EMPs wiąże i inaktywuje tlenek azotu, co skutkuje zwężeniem naczyń krwionośnych, nasileniem niedokrwienia [39, 84, 87, 91, 92] oraz aktywacją płytek krwi [81, 93] i komórek śródbłonka [94] (Rycina 3). Nowsze badania donoszą, że tlenek azotu może zachowywać funkcje biologiczne przez odwracalne wiązanie z resztą cysteiny (Cys-93) łańcucha β hemoglobiny, w rezultacie tworząc S-nitrozotiole, które są silnymi inhibitorami agregacji płytek krwi [86, 95, 96]. Podsumowując, pozakomórkowa Hb odgrywa ważną rolę w utrzymaniu równowagi hemostatycznej, może aktywować czynność płytek krwi poprzez zmiatanie NO lub działać jak inhibitor uwalniając funkcjonalne odpowiedniki tlenku azotu w postaci S-nitrozotiole [86].

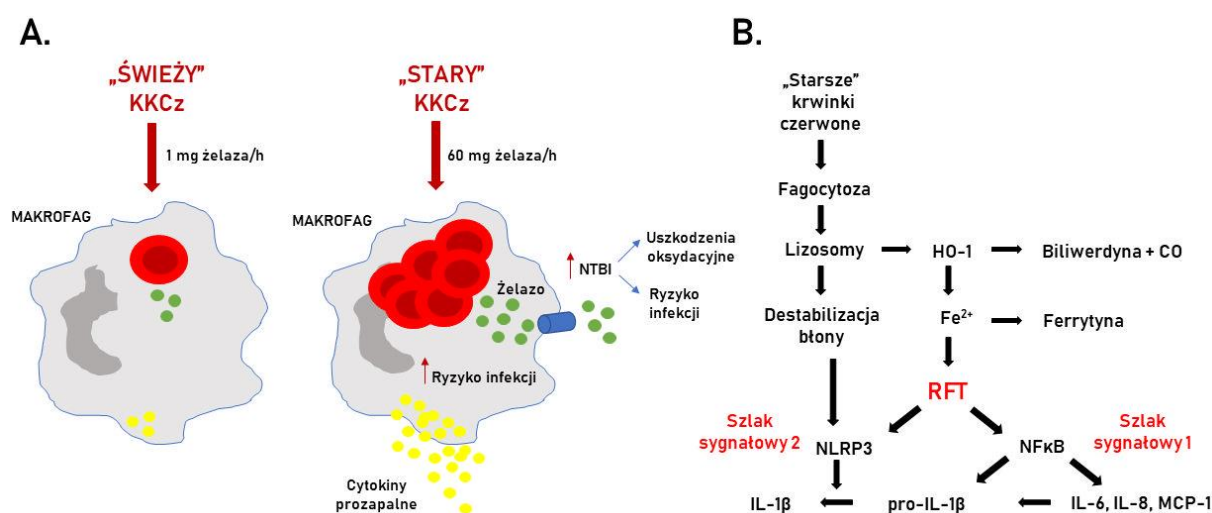


Rycina 3. Skutki nadmiaru pozakomórkowej hemoglobiny (Hb) w naczyniach krwionośnych. W warunkach fizjologicznych osoczowa haptoglobina (Hp) wiąże wolną Hb hamując jej aktywność pro-oksydacyjną. W sytuacji, gdy Hp nie jest w stanie wychwycić tak dużych ilości pozakomórkowej Hb dostarczonej podczas przetoczenia KKCz, niezwiązana, wolna Hb wychwytyje NO pochodzący ze śródbłonka, tworząc methemoglobinę (Met-Hb) i NO₂⁻. Zmniejszona biodostępność NO u biorców powoduje zmiany napięcia naczyniowego, aktywację płytek krwi i odpowiedź zapalną, co dalej może prowadzić do niedokrwienia tkanek i uszkodzenia narządów wewnętrznych. Opracowanie własne na podstawie [15, 65]. Skróty: Hb, hemoglobina; HO-1, oksygenaza hemowa-1; Hp, haptoglobina; Met-Hb, methemoglobina; NO, tlenek azotu; NTBI, żelazo niezwiązane z transferyną; RBC, krwinka czerwona.

Wolny hem, jako jeden ze składników supernatantów KKCz powoduje wzrost aktywności oksygenazy hemowej, generuje reaktywne formy tlenu (RFT) oraz aktywuje makrofagi i komórki śródbłonka [15, 97].

Przetaczanie „starych” jednostek KKCz może powodować przeciążenie organizmu biorcy żelazem (hemochromatozę wtórną) [38, 83, 98] i odkładanie złogów żelaza w nerkach, wątrobie i śledzionie [92]. Wszystkie możliwe formy żelaza niepołączone z transferyną,

a z białkami (tj. albumina, ceruloplazmina; *ang. high molecular weight-NTBI*) lub małowcząsteczkowymi ligandami (tj. ATP, AMP, cytrynian, mleczan, fosforan, octan; *ang. low molecular weight-NTBI*) stanowią pulę związków nazwanych NTBI (*ang. non-transferrin-bound iron*; żelazo niezwiązane z transferyną) [99]. NTBI może nasilać stres oksydacyjny w tkankach i narządach, a w konsekwencji upośledzać ich funkcjonowanie, powodować dysfunkcje komórek śródbłonna, zwiększać wirulencję niektórych patogenów, prowadzić do reakcji prozapalnych oraz odgrywać rolę w przebiegu zdarzeń naczyniowo-okluzyjnych (Rycina 4) [84, 90, 98, 100]. Około 25% przetoczonych krwinek czerwonych jest usuwana z krwioobiegu biorcy przez układ fagocytarny. Zwiększony wewnątrzkomórkowy poziom wolnego żelaza powoduje wzmożoną produkcję i uwalnianie prozapalnych cytokin przez fagocyty, co może skutkować nasiloną odpowiedzią zapalną w organizmie. Nadmiar wolnego żelaza z fagocytów prowadzi do podwyższonego poziomu NTBI, który może powodować wspomniane uszkodzenia oksydacyjne i proliferację bakterii ferrofilnych, co z kolei zwiększa ryzyko wystąpienia zakażenia związanego z przetoczeniem (Rycina 4) [87].



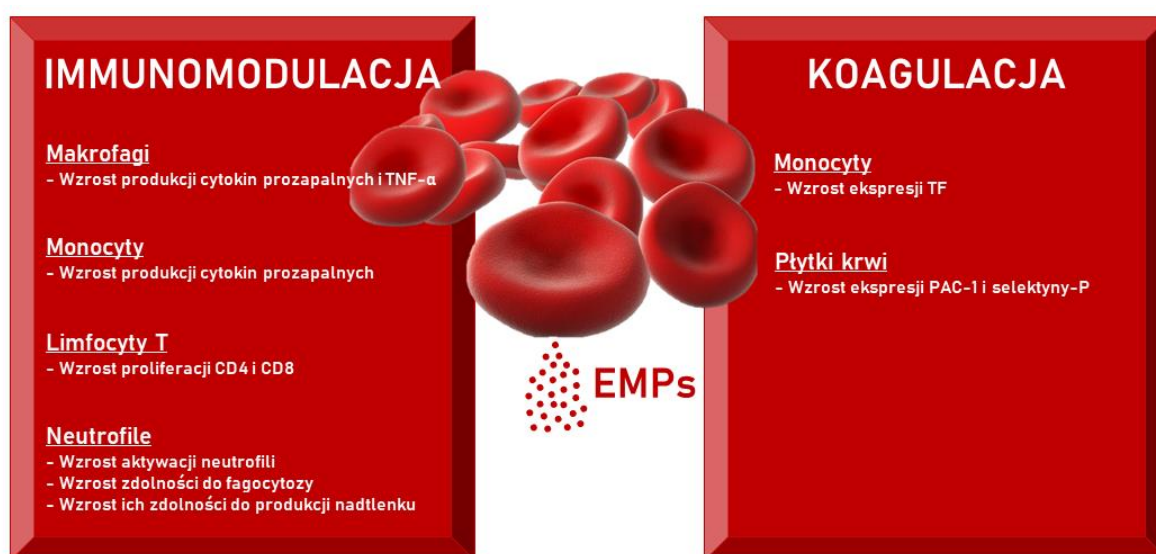
Rycina 4. Hipoteza dotycząca udziału żelaza w zakażeniu bakteryjnym po przetoczeniu starszych KKCz. (A) Żelazo uwolnione z Hb po wchłonięciu krwinek czerwonych przez makrofagi przedstawiają zielone kółka, wewnątrzkomórkowo syntetyzowane i uwalniane cytokiny to żółte kółka, niebieski cylinder w makrofagach przedstawia ferroportynę (kanał eksportu żelaza z wnętrza komórki). (B) Model przedstawiający hipotetyczny mechanizm pochłaniania „starszych” krwinek czerwonych przez makrofagi, w którym aktywacja czynnika NFkB oraz kompleksu inflamasyonu poprzez szlak sygnałowy 1 oraz 2, prowadzi do produkcji cytokin prozapalnych odpowiedzialnych za inicjację i podtrzymanie miejscowego stanu zapalnego. Opracowanie własne na podstawie [82]. *Skróty: CO, tlenek węgla; HO-1, oksygenaza hemowa-1; IL, interleukina; MCP-1, białko chemoatraktanta monocytów-1; NLRP, podtyp receptora NOD-podobnego; NTBI, żelazo niezwiązane z transferyną; RFT, reaktywne formy tlenu.*

2.1.2. Mikropęcherzyki pochodzenia erytrocytarnego

Mikropęcherzyki/mikrocząstki zewnątrzkomórkowe (*ang. MPs/MVs; microparticles/microvesicles*) to małe fosfolipidowe fragmenty uwalniane z błon komórkowych w wyniku przegrupowań cytoszkieletu i pofałdowań błony spowodowanych aktywacją, apoptozą lub starzeniem [1, 46, 101]. Mikropęcherzyki w zależności od wielkości czy sposobu w jaki dochodzi do ich powstawania nazywane są egzosomami, mikropęcherzykami, mikrocząstkami lub ciałkami apoptycznymi [15, 102]. MPs różnią się wielkością, ich średnica waha się od 30 nm do 1 μ m [1, 16]. Pośredniczą w komunikacji komórka-komórka przenosząc ładunek receptorów powierzchniowych, mRNA i mikroRNA z komórki macierzystej do docelowych. Dodatkowo mogą wiązać i łączyć się z błoną plazmatyczną komórki docelowej lub zostają przez nią pochłonięte [46, 101, 103]. W ostatnich latach poczyniono znaczne postępy w celu scharakteryzowania MPs pochodzących z komórek krwi i ocenie ich potencjalnej roli w zdrowiu i chorobie. Pierwszy raport o istnieniu MPs we krwi został opublikowany prawie 70 lat temu (dot. mikrocząstek pochodzenia płytkowego). Następnie w osoczu zidentyfikowano mikrocząstki pochodzące z krwinek czerwonych, monocytów, komórek śródbłonna i granulocytów [1, 101].

Przeprowadzone dotychczas badania potwierdzają gromadzenie się MPs wraz z wydłużaniem czasu przechowywania niefiltrowanych KKCz [77], jak i filtrowanych jednostek [104-106]. Zdecydowaną większość MPs stanowią te pochodzące z krwinek czerwonych (*ang. EMPs; erythrocyte-derived microparticles*), ale MPs pochodzące z leukocytów czy płytek krwi również występują w supernatantach KKCz (w szczególności w niefiltrowanych) oraz ich poziom zwiększa się podczas przechowywania [77, 107]. Potwierdzono, iż podczas przechowywania filtrowanych KKCz dochodzi również w głównej mierze do gromadzenia się EMPs [104-106] oraz fosfolipidów wykazujących aktywność prokoagulacyjną [106]. W EMPs zidentyfikowano, m.in. Hb, fosfatydyloserynę (PS), białko pasma 3, aktynę, glikoforiny, lipidy, białka tratw lipidowych, prokaspazy i kaspazy (3 i 8), Fas, FADD, CD47 i immunoglobulinę G [59, 87, 92]. Przenoszone przez EMPs cząsteczki sygnałowe (tj. cytokiny, chemokiny, hem, Hb, IgG, czynnik tkankowy, PS, składniki dopełniacza) oraz antygeny mogą wpływać negatywnie na organizm biorecy aktywując lub regulując, takie procesy jak angiogeneza, krzepnięcie, stan zapalny oraz odpowiedź immunologiczna, poprzez złożone interakcje z komórkami krwi i śródbłonkiem [87]. Ilość EMPs w supernatancie jednostek KKCz może wzrosnąć nawet 20-krotnie pod koniec okresu przechowywania, co bezpośrednio wpływa na jakość składnika krwi [15, 39, 101].

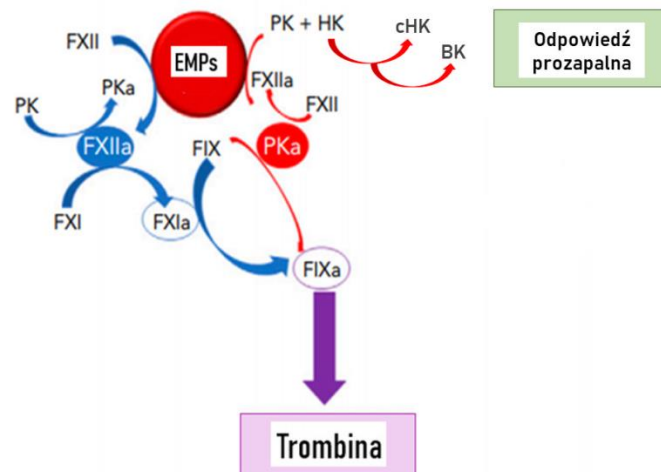
Przetoczenie dużej ilości nagromadzonych EMPs nie jest bez znaczenia dla biorców. EMPs mają zdolność wychwytywania NO, co wpływa na utlenowanie tkanek, a co w następstwie prowadzi do uszkodzenia narządów [39, 108]. Przypisywane są im także właściwości prozapalne, prokoagulacyjne, trombogenne, immunogenne (Rycina 5) [16, 92, 101, 109, 110]. Badania kliniczne wykazały, że przetoczenie dłużej przechowywanego KKCz związane jest ze zwiększoną częstością występowania zakrzepicy żył głębokich [22, 46]. Natomiast w badaniach *in vitro* zarówno EMPs pochodzące ze „świeżych” jak i przechowywanych KKCz wywoływały silną reakcję zapalną u biorcy przejawiającą się produkcją IL-6 i IL-8 oraz czynnika martwicy nowotworu (TNF- α) [101].



Rycina 5. Właściwości EMPs pochodzących z KKCz na podstawie dostępnych wyników badań *in vitro*. Opracowanie własne na podstawie [16, 76, 106, 111-113].

Badania nad mechanizmami odpowiedzialnymi za aktywność prokoagulacyjną EMPs prowadzone są od kilku lat [112]. Na ich podstawie wykazano, że EMPs uczestniczą w heterotypowych oddziaływaniach z monocytami, a ekspresja czynnika tkankowego w monocytach i osoczu wzrasta po ekspozycji na EMPs [112]. EMPs inicjują także powstawanie zmian fenotypowych w płytkach krwi, powodują zwiększenie ekspresji powierzchniowej selektyny-P oraz aktywowanego receptora GP IIb/IIIa [112, 114]. Zdecydowana większość uwalnianych EMPs wykazuje ekspozycję ujemnie naładowanych fosfolipidów (głównie PS) zapewniając powierzchnię do tworzenia kompleksów protrombinazy i tenazy [76, 103, 105, 115]. Rubin i in. [68] poszukiwali odpowiedzi na nurtujące ich pytanie dotyczące elementów układu krzepnięcia, które uczestniczą w inicjowaniu i propagowaniu prokoagulacyjnego działania EMPs. Odkryli, że EMPs

wykazują właściwości prokoagulacyjne zależnie od czynnika XI oraz mogą wpływać na wytwarzanie trombiny [68]. Kilka lat później dowiedziono, że EMPs przyczyniają się do wytwarzania trombiny poprzez kompleks protrombinazy [116]. Najnowsze doniesienia dotyczące potencjalnych mechanizmów aktywacji kaskady krzepnięcia indukowanej EMPs, co może leżeć u podstaw przetoczeniowych powikłań zakrzepowo-zapalnych wskazują, że EMPs bezpośrednio aktywują czynnik XII (FXII) oraz prekalikreinę, co następnie prowadzi do aktywacji FIX przez 2 niezależne szlaki: klasyczny FXIIa-FXI-FIX i bezpośrednią aktywację FIX przez kalikreinę (Rycina 6) [117, 118]. Zbadane szlaki są potencjalnymi celami w zapobieganiu powikłaniom zakrzepowym lub zapalnym związanym z przetoczeniem KKCz [118].



Rycina 6. Szlaki inicjacji kaskady krzepnięcia indukowane przez mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego obecne w KKCz. EMPs bezpośrednio promują aktywację FXII i PK, prowadząc do tworzenia FXIIa i PKa. Czynniki XIIa dodatkowo aktywuje PK, podczas gdy PKa aktywuje FXII. Do aktywacji czynnika IX dochodzi poprzez dwa niezależne szlaki. Szlak zaznaczony kolorem niebieskim, w którym FXIIa pośrednio aktywuje FIX po aktywacji FXI, oraz szlak alternatywny przedstawiony kolorem czerwonym, w którym PKa bezpośrednio aktywuje FIX. Oba szlaki ostatecznie prowadzą do tworzenia trombiny przez wspólny szlak. Opracowanie własne na podstawie [118, 119].

2.1.3. Cytokiny

Dane literaturowe wskazują, że w supernatantach przechowywanych KKCz gromadzą się czynniki immunomodulujące, tj. cytokiny prozapalne, których obecność może być potencjalną przyczyną występowania niepożądanych reakcji przetoczeniowych u biorców [38, 43, 83, 120, 121]. Cytokiny mogą napędzać ogólnoustrojową reakcję zapalną u pacjentów [38]. Ilość cytokin w KKCz jest bezpośrednio związana z obecnością białych krwinek w jednostce na początku okresu przechowywania. Częstość występowania reakcji przetoczeniowych po przetoczeniu UKKCz może się znacząco zmniejszyć z powodu

mniejszej ilości rozpuszczalnego CD40L oraz bioaktywnych lipidów w supernatantach tych jednostek w porównaniu do niefiltrowanych. Białe krwinki dawców uwalniają cytokiny oraz czynniki lipidowe wraz ze wzrostem czasu przechowywania, czynniki te mają zdolność, m.in. do aktywacji neutrofilii [38].

We wczesnych badaniach dowiedziono, iż w 40. dniu przechowywania dochodzi do znacznego zwiększenia poziomu IL-1 oraz IL-8 w supernatantach KKCz względem dnia pierwszego [120]. Wysokie poziomy TNF- α , IL-6 oraz IL-1 (czynników bezpośrednio hamujących erytropoezę poprzez blokowanie wytwarzania krwinek czerwonych w szpiku kostnym) potwierdziły również inne zespoły badawcze [122, 123]. TNF- α przede wszystkim odpowiedzialny jest za utrzymywanie homeostazy układu odpornościowego, ale pełni również kilka innych funkcji immunologicznych, tj. zdolność do wywoływania apoptotycznej śmierci komórek czy stanu zapalnego. Natomiast IL-6 jest mediatorem odpowiedzi fazy ostrej oraz gorączki [123].

W UKKCz również wykazano postępujący wzrost poziomu wielu mediatorów prozapalnych pochodzących z różnych typów komórek, tj. cytokiny, ligand CD40 i immunologicznie czynnych fosfolipidów [124]. Szczególne znaczenie mogą odgrywać lizofosfatydylocholina (lizo-PC) i rozpuszczalny ligand CD40 (sCD40L). Ten drugi jest prozapalnym mediatorem pochodzenia płytkowego, który wiąże się z CD40 obecnym na neutrofilach przylegających do śródbłonna [124]. Pomimo tego, iż filtracja przed przechowywaniem KKCz usuwa z niego zdecydowaną większość leukocytów i płytek krwi (i tym samym produktów z nich pochodzących) sugeruje się, iż niektóre czynniki prozapalne nadal mogą gromadzić się w istotnych klinicznie stężeniach. Jednym z nich jest uwalniana z białych krwinek chemokina CCL5, nazywana też RANTES (*ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), której ilość stopniowo wzrasta w supernatantach przechowywanych UKKCz. Chemokina ta indukuje proliferację i aktywację komórek NK oraz prowadzi aktywną rekrutację komórek T, bazofili, eozynofili i monocytów do miejsc zapalenia [124].

U pacjentów z nowotworem trzustki zaobserwowano zmniejszony wskaźnik przeżycia związany z okołoperacyjnym przetoczeniem KKCz. Zasugerowano, że progresja guza może być przyspieszana przez obecne w supernatantach cytokiny pro-nowotworowe oraz czynniki wzrostu [123]. Po dogłębnej analizie supernatantów otrzymanych z jednostek ubogoleukocytarnych (sLR) oraz niefiltrowanych (sNLR) otrzymanych w 1. oraz 42. dniu przechowywania wykazano podwyższoną ekspresję następujących rozpuszczalnych mediatorów nowotworowych, tj. białka chemotaktycznego monocytów-1 (MCP-1, stężenie

wzrastało wraz z czasem przechowywania), RANTES (stężenie niższe pod koniec okresu przechowywania w sLR, w 1. dniu przechowywania na podobnym poziomie), angiogeniny (brak wpływu czasu przechowywania na stężenie), czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α , brak różnic w poziomie pomiędzy sNLR a sLR oraz brak wpływu czasu przechowywania), naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) i czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF) (stężenie wzrastało wraz z czasem przechowywania NLR). Szczegółowe wyniki opisanych badań przedstawia Tabela 1 [123].

Tabela 1. Cytokiny o właściwościach pro-nowotworowych zidentyfikowane w świeżych i długo przechowywanych KKCz. Opracowano na podstawie [123].

	sNLR1	sNLR42	sLR1	sLR42
MCP-1	78,2 ± 7,3 pg/ml	647,8 ± 220,7 pg/ml	86,3 ± 6,3 pg/ml	121,2 ± 6,1 pg/ml
RANTES	12,0 ± 1,6 pg/ml	15,8 ± 0,7 pg/ml	13,8 ± 1,8 pg/ml	3,0 ± 1,9 pg/ml
Angiogenina	44,2 ± 3,7 pg/ml	-	niewykrywalne	-
TNF-α	-	-	-	-
EGF	216,4 ± 3,8 pg/ml	1436,4 ± 238,6 pg/ml	-	-
PDGF	61,6 ± 6,0 pg/ml	76,5 ± 1,7 pg/ml	-	-

Zawartość białych krwinek oraz „wiek” składnika krwi uważane są za główne czynniki decydujące o stężeniu cytokin w jednostkach KKCz. Należy także pamiętać, że przechowywane KKCz są niejednorodne i obserwowane jest duże zróżnicowanie osobnicze [38]. Leukoredukcja przed przechowywaniem zmniejsza ilość IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α w przechowywanych KKCz [120]. Nie zaobserwowano zmiany stężenia IL-6 w czasie przechowywania jednostek niefiltrowanych, zaś poziomy pozostałych badanych cytokin znacząco wzrastały wraz z czasem przechowywania [120]. W związku z tym, że filtracja przed przechowywaniem zmniejsza poziom wielu cytokin w supernatantach, w tym pro-nowotworowych, sugeruje się przetaczanie UKKCz wszystkim biorcom, a w szczególności pacjentom onkologicznym [123, 125].

Obecność takich mediatorów jak sCD40L (CD154), IL-6 i IL-8 w przechowywanych KKCz wiąże się z występowaniem niekorzystnych skutków u biorców (tj. gorączka, dreszcze, a nawet TRALI) [65].

2.1.4. Bioaktywne lipidy

Kolejnym potencjalnym czynnikiem przyczyniającym się do występowania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych (tj. TRALI), szczególnie we wrażliwych grupach biorców, mogą być bioaktywne lipidy [36, 38, 44, 126]. Wykazano, że niepolarne lipidy, tj. kwas arachidonowy (AA) i produkty jego utleniania, kwasy 5-, 12- i 15-

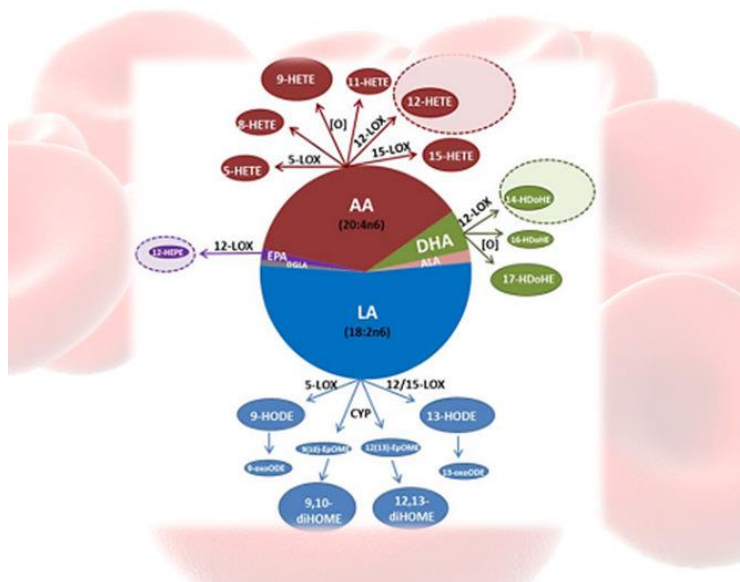
hydroksyeikozatetraenowe (HETE), uwalniane do supernatantu jednostki KKCz poprzez aktywację zanieczyszczających je neutrofilów, czy też PLTs, mogą być jedną z przyczyn występowania TRALI [79]. Lipidy gromadzące się w supernatantach KKCz należą do dwóch klas: lipidów niepolarnych i lizofosfatydylocholin [79], ilość tych drugich zredukowana jest poprzez filtrację [15].

Usuwanie białych krwinek i płytek krwi poprzez filtrację postrzegano jako skuteczną strategię w rozwiązaniu problemu udziału tych komórek w wytwarzaniu bioaktywnych lipidów w KKCz [44, 126]. Założenie to zostało jednak zakwestionowane przez Silliman'a i wsp. [79], którzy wykazali gromadzenie się trzech HETE i ich prekursora AA w przechowywanych UKKCz. Jedne z najbardziej szczegółowych badań metabolomu frakcji supernatantu KKCz przeprowadzone przez Fu i in. [44] donoszą, że podczas przechowywania stężenia niektórych klas bioaktywnych lipidów były niższe w jednostkach filtrowanych, ale wiele PUFAs i produktów ich utleniania gromadziło się w sposób podobny to obserwowanego w jednostkach niefiltrowanych.

Wartym podkreślenia jest fakt, iż w jednostkach filtrowanych stężenia 12-HETE, 14-HDoHE i 12-HEPE są ponad 30-krotnie niższe niż w niefiltrowanych, aczkolwiek tak duża różnica w poziomach badanych składników wystąpiła dopiero po 20. dniu przechowywania. We wcześniejszych punktach czasowych stężenia wspomnianych związków były nieznacznie wyższe w UKKCz względem jednostek filtrowanych. Ilość AA biorącego udział w sygnalizacji komórkowej i zapaleniu, zwiększa się wykładniczo wraz z czasem przechowywania KKCz. Natomiast 12-HETE wykazał największy wzrost stężenia podczas przechowywania jednostek niefiltrowanych, osiągając poziomy mikromolowe. Przypuszcza się, iż za taki stan odpowiada aktywność 12-LOX płytek krwi lub białych krwinek w niefiltrowanych KKCz [127]. 12-HETE uczestniczy w różnych procesach fizjologicznych jak i patologicznych, tj. stan zapalny, stres oksydacyjny i choroba nowotworowa [128].

Podsumowując, filtracja jednostek KKCz znacząco wpływała na zmniejszenie poziomu 12-HETE, 12-HEPE oraz 14-HDoHE, w których wytwarzaniu pośredniczy 12-LOX obecna w płytkach krwi i białych krwinkach. Z kolei podczas przechowywania stężenia wszystkich uwalnianych z błony komórkowej PUFAs (*ang. polyunsaturated fatty acids*) wzrastały pomimo filtracji. W 42. dniu przechowywania stężenia kwasu arachidonowego (AA), kwasu dokozaheksaenowego (DHA) i kwasu linolowego (LA) osiągnęły poziom rzędu $\mu\text{mol/litr}$ [44], czyli stężenie znacząco wyższe niż to, o którym wiadomo, że ma działanie biologiczne na ludzi [129, 130]. Wymienione PUFAs podczas przechowywania ulegają utlenianiu - peroksydacja tych lipidów może zachodzić nieenzymatycznie,

jak i za pośrednictwem enzymów pomimo filtracji jednostek [44]. Poziomy następujących PUFAs i produktów ich utleniania (oksylipin) znacząco wzrastały z czasem przechowywania, 5-, 8-, 9-, 11-, 12- i 15-HETEs z AA; kwas 9- i 13-hydroksooktadekadienowy (HODE); kwasy 9-, 10- i 12,13-dihydroksooktadecenowe z LA; 14-, 16- i 17-HDoHE z DHA [44] (Rycina 7).



Rycina 7. PUFAs i oksyliny w przechowywanych KKCz. Wykres kołowy przedstawia zawartość PUFAs w filtrowanych KKCz w 42. dniu przechowywania. Nad strzałkami zamieszczono potencjalny szlak produkcji oksyliny powiązanych z odpowiednim prekursorem. W niefiltrowanych jednostkach, 12-HETE, 14-HDoHE i 12-HEPE wykryto w znacznie wyższych stężeniach niż w leukoredukowanych. Opracowano na podstawie [44].

Szczegółowa analiza metabolomu frakcji supernatantu KKCz umożliwiła ocenę potencjalnych skutków klinicznych spowodowanych obecnością podwyższonych stężeń bioaktywnych lipidów. Wykazano, że przemywanie KKCz przed przetoczeniem może zmniejszyć poziom większości gromadzących się we frakcji supernatantu PUFAs i oksyliny [44]. Lipidy obecne w supernatantach KKCz aktywują śródbłonek i predysponują do ostrego uszkodzenia płuc, co może wyjaśniać występowanie niektórych niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych (m.in. TRALI) u pacjentów w stanie krytycznym [126]. Lipidy posiadają zdolność do pobudzenia neutrofilii *in vitro* [38, 79] oraz działają prozapalnie i prokoagulacyjnie [15]. Podanie szczurom LPS (ang. lipopolysaccharide) i bioaktywnych lipidów wyizolowanych z supernatantów KKCz wywołuje u nich ostre uszkodzenie płuc [79]. W osoczu pacjentów z TRALI wykazano obecność lipidów, które pobudzają neutrofile, co dodatkowo dostarczyło dowodów na związek między bioaktywnymi lipidami, a występowaniem TRALI [15].

Stres oksydacyjny zachodzący w KKCz stymuluje także wytwarzanie innych

mediatorów lipidowych, nazywanych F2-izoprostanami (F2-IsoP) i izofuranami (IsoF) [63]. Związki te gromadzą się w przechowywanych KKCz, filtracja zmniejsza ich stężenie w supernatancie, które ponownie wzrasta w czasie przechowywania. F2-IsoP i IsoF wywołują niekorzystny wpływ na czynność płytek krwi *in vitro*, co może przyczyniać się do powikłań poprzetoczeniowych *in vivo* [63].

2.1.5. Białka

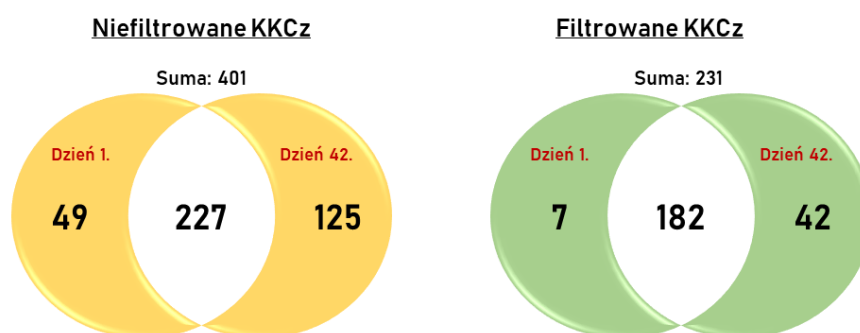
Pierwsze próby opracowania map białkowych supernatantów przechowywanych niefiltrowanych i filtrowanych KKCz przy pomocy technik proteomicznych (tj. dwuwymiarowa elektroforeza żelowa, spektrometria mas) podjęli w 2005 roku Anniss i in. [64]. Na podstawie wyników dwuwymiarowej elektroforezy żelowej zidentyfikowano większą ilość białek w niefiltrowanych supernatantach. W obu preparatach obserwowane były liczne białka osocza. Przy pomocy spektrometrii mas w supernatancie niefiltrowanych KKCz stwierdzono obecność kilku potencjalnie bioaktywnych białek, m.in. promotor adhezji neutrofilii i białko zmiatające fazy ostrej. Natomiast, w supernatantach UKKCz występowały głównie białka regulatorowe krwinek czerwonych [64].

Podczas rutynowego przechowywania KKCz, zarówno niefiltrowanych, jak i filtrowanych, stężenie białka w supernatantach było od 2- do 3-krotnie wyższe w ostatnim dniu ważności [131]. Leukoredukcja przed przechowywaniem zmniejsza o 42,4% całkowitą liczbę białek. W supernatantach niefiltrowanych jednostek KKCz zidentyfikowano 401 różnych białek, z czego stężenie 205. zwiększyło się (>2-krotnie) wraz z przechowywaniem (w tym 125 występowało tylko w 42. dniu), 98 pozostawało w niezmięnionej ilości, a w przypadku kolejnych 98. białek ich ilość zmniejszyła się (prawie 2-krotnie) w trakcie przechowywania (w tym obecność 49. stwierdzono tylko w 1. dniu). Natomiast, w supernatantach UKKCz zidentyfikowano 231 różnych białek. Wykazano, że w trakcie przechowywania stężenie 83. białek wzrasta ponad 2-krotnie (z czego 42 występowały tylko w dniu 42.), 124 pozostawały w niezmięnionej ilości, a stężenie 24. zmniejszyło się (prawie 2-krotnie) w czasie przechowywania (w tym zidentyfikowano 7 białek charakterystycznych tylko dla supernatantu z dnia 1.) (Rycina 8) [131].

W obu typach supernatantów KKCz wykazano wzrost ilości białek pochodzących z erytrocytów, tzn. strukturalnych, łańcuchów α - i β -hemoglobiny oraz enzymów biorących udział w procesie glikolizy oraz w ochronie antyoksydacyjnej. Typowe białka osocza stanowiły dużą pulę zidentyfikowanych białek zarówno w jednostkach niefiltrowanych, jak i filtrowanych

[131].

Zgodnie z oczekiwaniem, w supernatantach niefiltrowanych KKCz zaobserwowano wzrost (wraz z czasem przechowywania) stężenia białek specyficznych dla krwinek białych, tj. MPO, MMP-8, MMP-9, moezyna, jak i dla płytek krwi, tj. integryna alfa 2b, płytkowa glikoproteina V. Zidentyfikowano także wiele białek strukturalnych, tj. aktyna, α -aktynina-1, winkulina i talina-1 (ostatnie trzy są ważnymi białkami cytoszkieletu za pośrednictwem, których powstają kompleksy integrynowe) oraz wykazano wzrost aktywności kilku enzymów glikolitycznych, w tym α -enolazy, która bierze udział w aktywacji plazminy i może powodować degradację macierzy zewnątrzkomórkowej. W trakcie przechowywania stężenie niektórych białek supernatantu niefiltrowanych KKCz ulega znaczącemu zmniejszeniu, dotyczy to, m.in. lektyny 2 wiążącej mannozę, białka dopełniacza C4b, białka C i protrombiny, co może prowadzić do obniżenia odporności wrodzonej u biorców. Prawdopodobną przyczyną spadku stężenia tych białek jest proteoliza, ponieważ w trakcie przechowywania KKCz zwiększa się poziom proteaz, przy jednoczesnym spadku poziomu inhibitorów tych enzymów. Warty podkreślenia jest fakt, że białka cytoszkieletu, tj. α -aktynina-1, winkulina i talina-1, wydają się być odporne na proteolizę, co mogłoby tłumaczyć wzrost stężenia tych białek podczas przechowywania [131].



Rycina 8. Białka zidentyfikowane w supernatantach niefiltrowanych oraz filtrowanych KKCz w 1. i 42. dniu przechowywania. Opracowano na podstawie [131].

W filtrowanych KKCz mniejsza liczba białek zwiększa swoje stężenie w trakcie przechowywania, w porównaniu do niefiltrowanych jednostek. Podczas przechowywania UKKCz z krwinek czerwonych uwalniane są przeciwutleniacze, tj. Prdx1, Prdx2 i Prdx6, które zidentyfikowano w supernatantach. Z kolei, obecność aktywnej fosfolipazy i jej sukcesywny wzrost podczas przechowywania, może wyjaśniać wytwarzanie 5-, 12- i 15-HETE, z uwolnionego z błon krwinek czerwonych kwasu arachidonowego. Sugeruje się, że te bioaktywne lipidy mogą brać udział w wywoływaniu TRALI *in vivo*. Podczas

przechowywania filtrowanych KKCz w supernatancie zmniejsza się także liczba biologicznie ważnych białek, w tym cystatyny C i kininogenu-1. Konsekwencją spadku poziomu tych białek, u biorców masywnych transfuzji, może być upośledzone hamowanie proteaz cysteinowych, wiążącego mannozę białka 2 oraz innych efektorów w odporności wrodzonej. Dodatkowo, zmniejszenie stężenia inhibitora metaloproteiny 1 może zwiększać podatność biorcy na działanie proteaz, co zwiększa ryzyko prozapalnej aktywacji komórek śródbłonna wyściełających łożysko naczyniowe poprzez aktywację PARs (*ang. protease-activated receptors*; receptory aktywowane przez proteazy), prowadzącą do sekwestracji neutrofilii i obniżenia odporności wrodzonej [131].

Większość białek gromadzących się w supernatantach podczas przechowywania, to białka wewnątrzkomórkowe, które są uwalniane z komórek w wyniku ich lizy lub na skutek zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej związanej z oksydacyjnymi uszkodzeniami, zachodzącymi w warunkach przechowywania krwinek *ex vivo*. Białka te, przetoczone razem z KKCz, mogą działać bezpośrednio lub dostarczać substratów do produkcji mediatorów. Na przykład, Prdx6 może odpowiadać za gromadzenie się mediatorów lipidowych w supernatantach KKCz, które mogą przyczyniać się do występowania TRALI. Natomiast, uwolnione z komórek enzymy (m.in. proteolityczne), pełniące określone funkcje wewnątrzkomórkowe, mogą działać w przypadkowy, nieoczekiwany sposób na białka obecne w supernatantach [131].

Analiza proteomiczna umożliwia identyfikację białek, które być może w przyszłości znajdą zastosowanie jako biomarkery jakości KKCz [48, 132]. Alessandro i in. [48] na podstawie przeprowadzonej analizy składu białkowego supernatantów KKCz wyłonili białka, tj. dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanu, peroksyreoksyna-1, -2 i -6, anhydraza węglanowa-1 i -2, białko wiążące selen-1, reduktaza biliwerdyny, dehydrataza aminolewulinianowa oraz katalaza, do dalszych badań pod kątem ich potencjalnej przydatności jako biomarkery jakości przechowywanych krwinek czerwonych.

3. Transfuzja „świeże” vs. „stare” KKCz – aspekt kliniczny

3.1. Randomizowane badania kliniczne

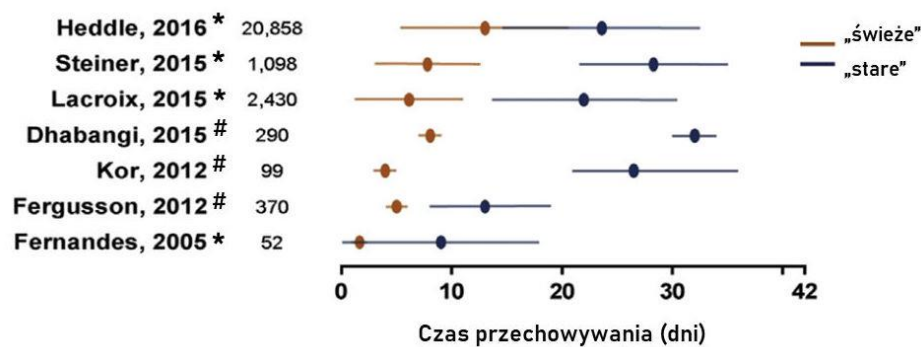
Przetaczanie KKCz jest zabiegiem ratującym życie pacjentom, m.in. z chorobami nowotworowymi i hematologicznymi, czy też chorym z oddziałów intensywnej opieki medycznej, ale każda transfuzja wiąże się też z ryzykiem wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Progresywne zmiany zachodzące w KKCz podczas ich przechowywania w RCKiK są dobrze opisane i udokumentowane, natomiast kliniczne konsekwencje przetaczania KKCz, szczególnie dłużej przechowywanych (z zaakceptowaną datą ważności do 42 dni), są mało poznane i niejasne.

Ocena wpływu czasu przechowywania KKCz na występowanie reakcji poprzetoczeniowych u biorców jest bardzo trudna ze względu na mnogość czynników na nie oddziałujących. Jednym z problemów okazało się również przyjęcie jednej, powszechnie akceptowanej definicji jednostki „świeżej” oraz „starej” (Rycina 9) [39, 41]. Niejednoznaczne dane dotyczące znaczenia klinicznego czasu przechowywania KKCz od wielu lat są tematem kontrowersyjnym dla klinicystów i transfuzjologów.

Randomizowane badania kliniczne (*ang. RCT; randomized clinical trial*) dostarczają najbardziej wiarygodnych dowodów dotyczących znaczenia czasu przechowywania KKCz w ocenie ryzyka wystąpienia i/lub nasilenia poprzetoczeniowych niepożądanych reakcji u biorców [133]. Przyczynkiem do prowadzenia RCT były niespójne wyniki wielu przeprowadzonych obserwacyjnych badań kohortowych o charakterze retrospektywnych badań klinicznych, badających związek pomiędzy dłuższym czasem przechowywania KKCz, a występowaniem niekorzystnych skutków klinicznych, tj. śmiertelność, zapalenie płuc, poważne infekcje, niewydolność wielonarządowa i długość pobytu w szpitalu w wielu grupach biorców (m.in. ofiar rozległych urazów, pacjentów w stanie krytycznym, czy poddawanych zabiegom kardiochirurgicznym) [39, 133, 134]. Prawidłowa interpretacja wyników retrospektywnych badań kohortowych jest niezwykle trudna i nieuchronnie narażona na szereg wewnętrznych błędów, które powodują, iż wyciągane są nieodpowiednie wnioski [39, 41].

Przez prawie 25 lat rosnąca liczba obserwacyjnych badań retrospektywnych i prospektywnych wskazywała, że pacjenci otrzymujący starsze KKCz są narażenie na zwiększone ryzyko zachorowalności i śmiertelności w porównaniu z biorcami, którym przetoczono świeże jednostki [39]. Największe badanie tego typu przeprowadzili Koch i wsp. [24] na podstawie przeglądu bazy danych z jednego ośrodka kardiochirurgicznego w Stanach

Zjednoczonych. Autorzy porównali ze sobą dwie duże grupy pacjentów, w jednej z nich biorcy otrzymywali KKCz przechowywane ≤ 14 dni (2872 pacjentów), a w drugiej >14 dni (3130 pacjentów) [24]. Wykazano istotny związek pomiędzy przetoczeniem starszych KKCz, a zwiększoną śmiertelnością i występowaniem innych niekorzystnych skutków klinicznych [39]. Głównym zarzutem odnoszącym się do wiarygodności otrzymanych wyników był fakt, iż pacjenci w kohorcie otrzymującej „stare” KKCz bardzo często wymagali masowej transfuzji (>6 jednostek), co uznawane jest za czynnik prognostyczny negatywnych skutków transfuzji [134].



Rycina 9. Średni czas przechowywania KKCz wykorzystanych w ostatnich badaniach klinicznych. (*, średnia \pm SD; #, mediana \pm percentyl 25 i 75). Opracowano na podstawie [39].

W związku z brakiem spójności wyników badań obserwacyjnych rozpoczęto poszukiwanie odpowiedzi w badaniach typu RCT (Tabela 2). Wyniki jednego z ostatnich wielośrodkowego, międzynarodowego, podwójnie ślepego, randomizowanego badania klinicznego (*ang.* **ABLE**; *Age of **B**lood **E**valuation*) przeprowadzonego na bazie danych otrzymanych z kilku krajów europejskich (Francji, Holandii, Wielkiej Brytanii) i Kanady nie wykazało korzystnego, pod względem klinicznym, wpływu przetaczania „świeżych” KKCz (przechowywanych ≤ 7 dni) w porównaniu do „wieku” standardowo stosowanych jednostek KKCz w grupie krytycznie chorych (pacjenci ≥ 18 lat; w Szkocji ≥ 16 lat) z 64 biorących udział w badaniu oddziałów OIOM [134]. W podobnie zaplanowanym (prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby), randomizowanym badaniu w grupie 377 wcześniaków (*ang.* **ARIP**; *Age of **R**ed **B**lood **C**ells **I**n **P**remature **I**nfants*) z sześciu oddziałów OIOM w Kanadzie również nie wykazano pożytecznego wpływu przetaczania świeżych jednostek KKCz (≤ 7 dni) względem standardowo stosowanych (średni czas przechowywania 14,6 dnia) na zachorowalność (martwicze zapalenie jelit, retinopatia wcześniaków, dysplazja oskrzelowo-płucna, krwotok dokomorowy), a także śmiertelność tej grupy biorców [30]. Na podstawie wyników badania o nazwie **TRANSFUSE** (*ang.* **ST**anda**R**d **I**ssue **Tr**ANsfusion versus **S** **F**resher

Red-Cell Use in Intensive Care) bardzo podobnego do badania ABLE, z tym wyjątkiem, że przeprowadzonego na 2-krotnie większej grupie krytycznie chorych z OIOM h również nie wykazano istotnego wpływu wieku przetoczonych KKCz na śmiertelność biorców.

Wyniki wielośrodkowego, randomizowanego badania pacjentów kardiologicznych poddawanych zabiegowi chirurgicznemu i transfuzji KKCz (*ang. RECESS; Red-Cell Storage Duration Study*) również nie dowiodły, aby przetaczanie jednostek KKCz przechowywanych ponad 21 dni (*versus* <10) wiązało się z istotnie częstszym występowaniem niewydolności wielonarządowej u biorców [135]. Obecnie prowadzone jest wielośrodkowe, międzynarodowe, wykorzystujące metodę podwójnie ślepej próby, randomizowane badanie (*ang. ABC PICU; Age of Blood in Children in Pediatric Intensive Care Unit*) obejmujące grupę dzieci w stanie krytycznym [136].

Ocena ryzyka śmiertelności wewnątrzszpitalnej związanej z przetaczaniem KKCz przechowywanych dłużej niż 35 dni na podstawie wtórnej analizy wielośrodkowego randomizowanego badania (*ang. INFORM; Informing Fresh versus Old Red cell Management*) także nie dostarczyła dowodów na związek pomiędzy tymi zmiennymi w grupie osób dorosłych (≥ 18 lat) przyjętych do jednego z sześciu szpitali ogólnych w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Australii i Izraelu [137]. Brak różnic pomiędzy badanymi grupami może wynikać z kilku ograniczeń, m.in. z faktu, że niektórzy pacjenci otrzymywali jednostki KKCz w różnym czasie przechowywania, co znacząco zaburza prawidłową interpretację uzyskanych wyników, a także z powodu braku informacji w dokumentacji medycznej o chorobach współistniejących i wskazaniach do przetoczenia [39]. Badanie INFORM jest jak dotąd największym przeprowadzonym badaniem randomizowanym analizującym wpływ czasu przechowywania na śmiertelność biorców.

Podsumowując, wyniki dobrze kontrolowanych, wielośrodkowych, randomizowanych badań klinicznych wykazały, że wiek KKCz niekoniecznie musi mieć związek z występowaniem niepożądanych skutków klinicznych w różnych populacjach pacjentów [133]. Różnice w wynikach przeprowadzonych RCT i retrospektywnych oraz prospektywnych badań mogą częściowo wynikać z charakteru obserwacyjnego tego typu badań, stosunkowo małej liczebności badanych grup pacjentów, czy też niespójnej definicji „świeżych” i „starych” KKCz. Każdy z tych czynników dodaje dodatkową zmienną w przeprowadzanych badaniach, co prawdopodobnie prowadzi do wyciągania znacząco różnych wniosków [133].

Tabela 2. Randomizowane kontrolne badania kliniczne (RCT) badające wpływ przetoczenia „świeżych” i „starych” KKCz w różnych grupach badanych. Opracowanie własne na podstawie [30, 57, 62, 134-139].

Nazwa badania	„Świeży” KKCz	„Stary” KKCz		Grupa badana	Wielkość badania (N)	Oceniano	Państwa biorące udział w badaniu
ABLE	≤ 7 dni $\bar{x} = 6,1 \pm 4,9$ (N = 1211)	Standardowo stosowany $\bar{x} = 22,0 \pm 8,4$ (N = 1219)		Krytycznie chorzy dorośli (≥ 18 lat) z OIOM	2 430	Śmiertelność po 90 dniach od przetoczenia	Kanada Francja Holandia UK
ARIPI	≤ 7 dni $\bar{x} = 5,1 \pm 2,0$ (N = 188)	Standardowo stosowany $\bar{x} = 14,6 \pm 8,3$ dnia (N = 189)		Wcześnieiki z OIOM	377	Niewydolność narządów i poważne zakażenia po 90 dniach od przetoczenia	Kanada
RECESS	≤ 10 dni Me = 7 dni N = 538	≥ 21 dni Me = 28 dni N = 560		Pacjenci po operacji kardiochirurgicznej (≥ 12 lat)	1 098	Niewydolność wielonarządowa	USA
ABC PICU	≤ 7 dni	Standardowo stosowany		Krytycznie chore dzieci z OIOM	1 538	Niewydolność wielonarządowa	USA Kanada Francja Włochy Izrael
Red Cell Storage Curation and Outcomes in Cardiac Surgery	≤ 14 dni	≥ 20 dni		Pacjenci kardiochirurgiczni	2 800	Śmiertelność po 30 dniach od przetoczenia	USA
TRANSFUSE	$\bar{x} = 11,8$ dnia (N = 2457)	Standardowo stosowany $\bar{x} = 22,4$ dnia (N = 2462)		Krytycznie chorzy dorośli (≥ 18 lat) z OIOM	4 919	Śmiertelność po 90 dniach od przetoczenia	Australia Nowa Zelandia Finlandia Irlandia
INFORM	≤ 7 dni (N = 1392)	8-35 dni (N = 18854)	> 35 dni (N = 4480)	Krytycznie chorzy	24 736	Śmiertelność wewnątrzszpitalna	Australia Kanada Izrael USA

4. KKCz w leczeniu niedokrwistości u pacjentów onkologicznych

Według definicji WHO o występowaniu niedokrwistości mówimy, gdy stężenie Hb w krwi pacjenta spada poniżej 11 g/dl, spadek poniżej 6,5 g/dl stanowi zagrożenie życia (Tabela 3) [140, 141]. Anemia bardzo często towarzyszy przebiegowi choroby nowotworowej oraz stanowi negatywny czynnik rokowniczy bezpośrednio związany z pogorszeniem jakości życia chorego spowodowany, m.in. niewystarczającym utlenowaniem tkanek [140, 142]. Przyczyny występowania niedokrwistości u pacjentów onkologicznych mają wieloczynnikową etiologię, m.in. stan ten może wynikać z dużej utraty krwi podczas zabiegu chirurgicznego, naciekania szpiku kostnego przez komórki nowotworowe (jak w przypadku białaczek), przewlekłej niewydolności nerek oraz wprowadzonego leczenia (jako skutek radioterapii lub chemioterapii) [34, 140, 142]. Pacjenci onkologiczni najczęściej obciążeni są tzw. niedokrwistością towarzyszącą nowotworom (*ang. CRA; cancer related anaemia*) [140] lub niedokrwistością zapalną (*ang. AI; anaemia of inflammation*) [143]. Anemia najczęściej występuje u chorych na nowotwory hematologiczne [34].

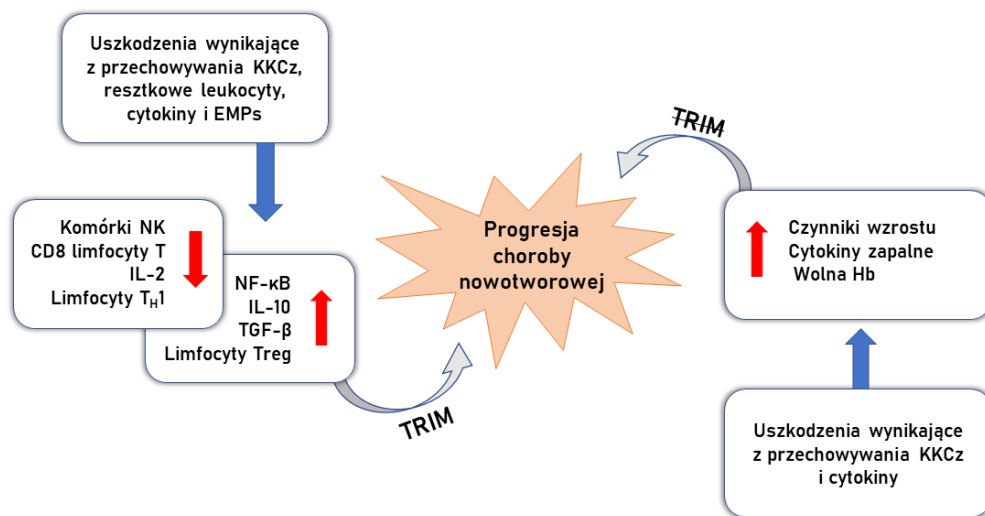
Tabela 3. Stopnie nasilenia niedokrwistości względem stężenia hemoglobiny we krwi pacjenta (wg. danych WHO) [140].

Stopień nasilenia niedokrwistości	Stężenie Hb [g/dl]
Łagodna	11,0 – 9,5
Umiarkowana	9,4 – 8,0
Ostra	7,9 – 6,5
Zagrażająca życiu	Poniżej 6,5

Przetaczanie KKCz, suplementacja żelazem, czy podawanie erytropoetyny – to najczęściej stosowane sposoby leczenia niedokrwistości [140, 144-146]. Należy zwrócić szczególną uwagę, że podczas przechowywania KKCz w warunkach *ex vivo* z komórek do supernatantu uwalniane są różnego rodzaju mediatory, które mogą wykazywać, m.in. działanie immunosupresyjne, pro-nowotworowe czy pro-zapalne [15]. Dożylnie podanie żelaza (w formie Fe(OH)₃ skompleksowanego z karboksymaltozą, dawka 750 mg) wiąże się z 10-krotnie mniejszym ryzykiem wystąpienia negatywnych skutków leczenia niż w przypadku transfuzji KKCz, natomiast może prowadzić do zespołu przeładowania żelazem, czyli hemosyderozy [145]. Niewątpliwie zaletą leczenia niedokrwistości koncentratem czerwonych krwinek jest szybki efekt terapeutyczny.

Dostępne dane literaturowe wskazują, że przetoczenie KKCz pacjentom onkologicznym wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy [147] lub nawrotu

choroby nowotworowej oraz zwiększoną śmiertelnością biorców po chirurgicznej resekcji guza w raku wątroby, jelita grubego, żołądka, narządów płciowych, płuc, prostaty, piersi, głowy i szyi [3, 147-149]. Przypuszcza się, iż w przypadku pacjentów onkologicznych poddawanych poważnym zabiegom chirurgicznym szczególnie istotne jest immunosupresyjne działanie KKCz polegające na upośledzeniu funkcji komórek NK i cytotoksycznych limfocytów T (Tc) [150]. Po całkowitym wycięciu zmiany nowotworowej, prawidłowo funkcjonujące mechanizmy nadzoru immunologicznego w organizmach pacjentów są w stanie usunąć komórki nowotworowe, które przedostały się do krwiobiegu podczas zabiegu operacyjnego, zminimalizować chorobę resztkową oraz zapobiec wczesnemu tworzeniu się mikroprzerzutów [150]. Zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych, jak i w badaniach klinicznych zaobserwowano wyższy odsetek nawrotów choroby nowotworowej związany z okołoperacyjnym przejściowym osłabieniem nadzoru immunologicznego za pośrednictwem komórek NK i limfocytów Tc [151, 152]. Okołoperacyjne przetoczenie KKCz może zwiększać ryzyko nawrotu nowotworu po chirurgicznej resekcji guza poprzez wpływ przetoczonych krwinek na nadzór immunologiczny pacjenta [150].



Rycina 10. Mechanizmy progresji choroby nowotworowej po przetoczeniu KKCz. Transfuzja krwinek czerwonych sprzyja nawrotowi lub progresji raka poprzez mechanizmy obejmujące immunomodulację, stan zapalny i działanie czynników wzrostu. Opracowano na podstawie [153]. *Skróty: IL, interleukina; KKCz, koncentrat krwinek czerwonych; NF-κB: czynnik jądrowy kappa B; TGF-β, transformujący czynnik wzrostu β; Treg, limfocyty T regulatorowe; TRIM, immunomodulacja związana z przetoczeniem.*

Już w 1988 roku Tartter i in. [154] opisywali możliwe immunosupresyjne działanie okołoperacyjnego przetoczenia krwi u pacjentów z rakiem jelita grubego, powodującego częstsze występowanie zakażeń pooperacyjnych i innych powikłań. Jedne z pierwszych opublikowanych wyników RCT przeprowadzone na początku lat 90. XX wieku nie dostarczyły jednak dowodów, iż przetoczenie KKCz wpływa na zwiększenie ryzyka nawrotu choroby

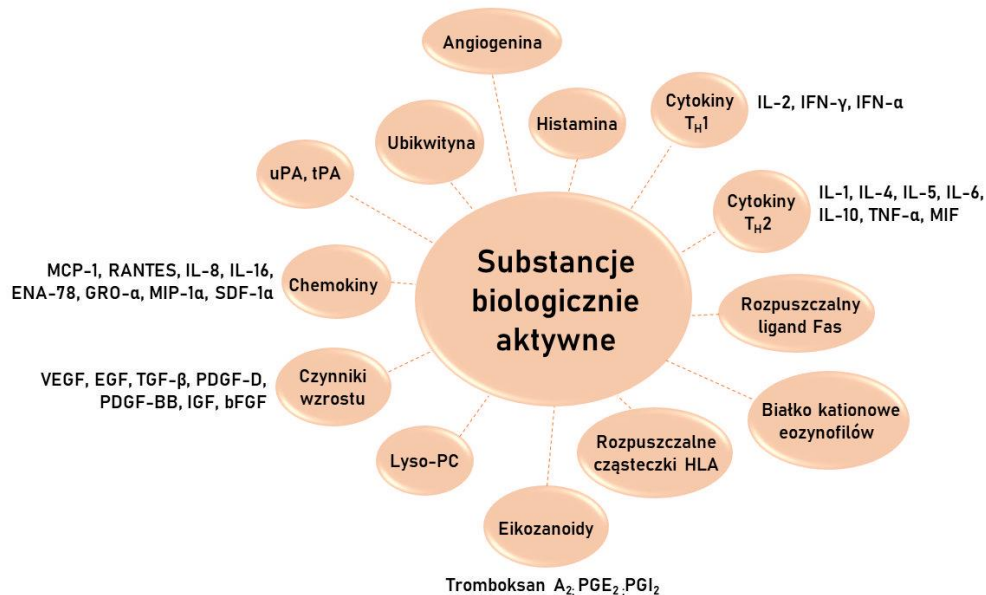
nowotworowej [155, 156]. Jednakże, dostępne metaanalizy retrospektywnych badań obserwacyjnych u chorych na różne typy nowotworów, u których przeprowadzono resekcję guza, wykazały zwiększone ryzyko nawrotu choroby w grupach chorych, którym przetoczono KKCz (Tabela 4) [157-160]. Coraz więcej dowodów klinicznych sugeruje, że transfuzja KKCz może w rzeczywistości prowadzić do negatywnych wyników klinicznych (nawrót choroby, zwiększona śmiertelność, ogólne złe rokowanie, przerzutów) u pacjentów z nowotworami różnych typów (m.in. raka przełyku, żołądka, wątroby, jajnika) [144, 161]. Mechanizmami odpowiedzialnymi za zwiększone ryzyko nawrotu choroby nowotworowej lub śmierci po przetoczeniu KKCz są immunosupresja, stan zapalny oraz działanie mediatorów (cytokin, chemokin, czynników wzrostu, rozpuszczalnych mediatorów, elementów komórkowych) i składników krwi zdolnych do aktywacji angiogenezy i ścieżek przeżycia w transformowanych komórkach. Mechanizmy te dzieli się na związane z immunomodulacją (*ang. TRIM; transfusion-related immunomodulation*) oraz nieimmunologiczne (Rycina 10) [153, 162].

Z powodu niejednoznacznych doniesień literaturowych oraz niewielkiej liczby dobrze przeprowadzonych randomizowanych badań kontrolnych to czy okołooperacyjne przetoczenie KKCz zwiększa śmiertelność i ryzyko nawrotu choroby nowotworowej u pacjentów po interwencji chirurgicznej wciąż pozostaje kwestią dyskusyjną [150, 163].

4.1. Mediatory pro-nowotworowe i pro-zapalne w supernatantach KKCz

W szeregu fizjologicznych procesów komórkowych, tj. apoptoza, proliferacja, migracja, stan zapalny czy rozwój i regeneracja tkanek ważną rolę odgrywają rozpuszczalne białkowe mediatory międzykomórkowe o masie poniżej 30 kDa czyli cytokiny [164-166]. Na różnych etapach rozwoju nowotworu (inicjacja, promocja, wzrost, inwazja, przerzutowanie) obserwowane są zmiany w ich uwalnianiu [167]. Działanie cytokin może polegać na indukcji transformacji nowotworowej, stymulacji angiogenezy, kontroli migracji komórek nowotworowych czy działaniu anty-apoptotycznym lub immunosupresyjnym. Warty podkreślenia jest fakt ich plejotropowego działania [165-168]. Wiele cytokin wykazuje zarówno aktywność przeciwnowotworową (tj. TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-6, IL-12, interferony), którą zaobserwowano w różnych nowotworach na podstawie badań na liniach komórkowych i modelach zwierzęcych [164]. Dowiedziono, iż aktywność cytokin zależy od ich stężenia i stopnia zaawansowania (zróznicowania) choroby. Wysokie stężenia mogą działać hamująco na wzrost ludzkich linii komórek nowotworowych, zaś niskie oddziaływać pobudzająco. Natomiast, w słabiej zróżnicowanych liniach komórkowych wzrost komórek

może być hamowany przez daną cytokinę, a w dobrze zróżnicowanych być wzmagany. Zgodnie z przyjętą koncepcją w środowisku nowotworu obserwowana jest przewaga cytokin typu Th₂ i Th₃ względem Th₁. Teoria „pól cytokinowych” dotycząca całkowitego stężenia obecnych cytokin w określonym miejscu i czasie pozwala podjąć próbę w zrozumieniu udziału cytokin np. w chorobie nowotworowej [34, 166].



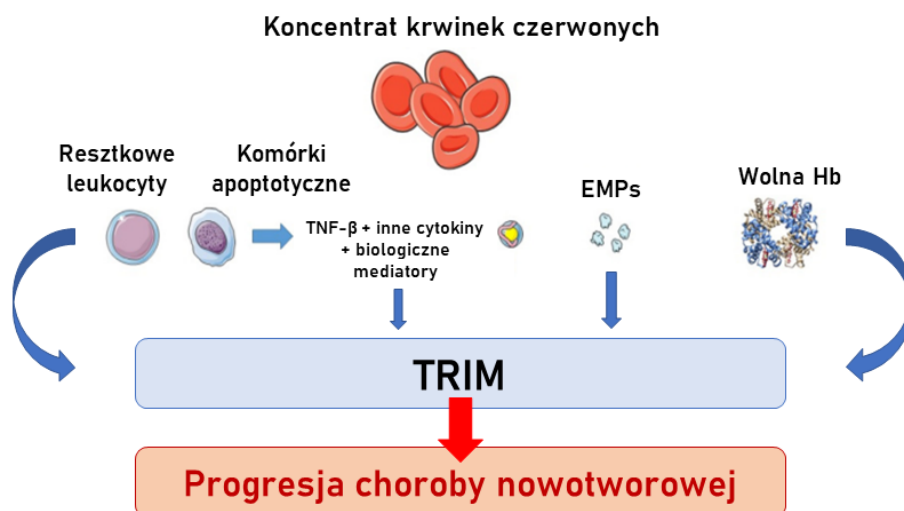
Rycina 11. Mediatory pro-nowotworowe i pro-zapalne obecne w supernatantach KKCz. Opracowanie własne na podstawie [15, 34, 38, 123, 133, 169-174]. *Skróty: bFGF (ang. basic fibroblast growth factor), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów; EGF (ang. epidermal growth factor), naskórkowy czynnik wzrostu; ENA (ang. neutrophil-activating protein), białko aktywujące neutrofile; GRO (ang. growth-related oncogene), onkogen związany ze wzrostem; IFN (ang. interferon), interferon; IGF (ang. insulin-like growth factor), insulinopodobny czynnik wzrostu; IL (ang. interleukin), interleukina; Lyso-PC (ang. lysophosphatidylcholine), lizofosfatydylocholina; MCP (ang. monocyte chemoattractant protein), białko chemotaktyczne monocytów; MIF (ang. macrophage migration inhibitory factor), czynnik hamujący migrację makrofagów; MIP (ang. macrophage inflammatory protein), białko makrofaga aktywowanego; PDGF (ang. platelet-derived growth factor), płytkowy czynnik wzrostu; PGE2 (ang. prostaglandin E2), prostaglandyna E2; PGI2 (ang. prostacyclin I2), prostacyklina I2; SDF (ang. stromal cell-derived factor), zrębowy czynnik wzrostu; TGF (ang. transforming growth factor β), transformujący czynnik wzrostu; TNF (ang. tumor necrosis factor), czynnik martwicy nowotworu; tPA (ang. tissue-type plasminogen activator), tkankowy aktywator plazminogenu; uPA (ang. urokinase-type plasminogen activator), urokinazowy aktywator plazminogenu; VEGF (ang. vascular endothelial growth factor), czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego.*

Zrozumienie złożoności pełnionych przez cytokiny funkcji w różnych stadiach choroby nowotworowej może przyczynić się do rozwoju skutecznych terapii przeciwnowotworowych z ich wykorzystaniem [164, 165]. W trwających obecnie badaniach klinicznych oceniane jest bezpieczeństwo i skuteczność nowych przeciwnowotworowych immunoterapii cytokinowych opartych na blokowaniu lub pobudzaniu działania wybranych cytokin (tj. IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, TNF-α, TGF-β, VEGF, MCP-1, RANTES) [164]. W związku z rosnącym zainteresowaniem rolą miRNA w regulacji mechanizmów związanych z przekazywaniem sygnałów przez cytokiny oraz ich udziałem w stanie zapalnym, związanym z chorobą nowotworową, w przyszłości prawdopodobnie możliwe będzie wykorzystanie wyselekcjonowanych miRNA jako nowych cząsteczek terapeutycznych w leczeniu raka [175].

Mediatory biologiczne (angiogenne czynniki wzrostu, czynniki onkogenne) gromadzące się w supernatantach KKCz dostarczane do organizmu biorcy podczas transfuzji przedstawiono na Rycinie 11.

4.2. Wpływ przetoczenia KKCz na pacjentów onkologicznych

Pacjenci onkologiczni są specyficzną grupą biorców [34]. Od wielu lat składniki krwi stosowane są jako jeden z elementów w nie chirurgicznym, jak i chirurgicznym leczeniu pacjentów onkologicznych, u których występuje niedokrwistość [176]. Pacjenci z guzami litymi poddawani operacjom są bardziej narażeni na wystąpienie anemii w okresie okołoperacyjnym z powodu krwawienia związanego z interwencją chirurgiczną [176]. Wskazaniem do przetoczenia KKCz jest znaczna utrata krwi, zaś do transfuzji świeżo mrożonego osocza i koncentratu krwinek płytkowych występowanie zaburzeń krzepnięcia i małopłytkowość [3, 144, 176]. Upośledzone mechanizmy nadzoru immunologicznego u biorców po przetoczeniu KKCz spowodowane obecnością komórek apoptotycznych, resztkowych białych krwinek i mediatorów odpowiedzi biologicznej (wolnej Hb, cytokin immunosupresyjnych, rozpuszczalnych mediatorów i peptydu HLA, mikropęcherzyków zawierających Hb czy aktywnego czynnika wzrostu) w supernatantach przechowywanych KKCz powiązано z występowaniem progresji i nawrotów choroby nowotworowej (Rycina 12) [144, 162].



Rycina 12. Patofizjologia TRIM i jej wpływ na wzrost nowotworu i przerzuty. Opracowano na podstawie [162].
Skróty: EMP (ang. erythrocyte-derived microparticles), mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego; Hb (ang. haemoglobin), hemoglobina; TNF- β (ang. tumor necrosis factor- β), czynnik martwicy nowotworu- β .

Immunomodulujący wpływ przetoczenia KKCz opisywany jest od wielu lat. TRIM jest złożoną, wieloczynnikową immunologiczną reakcją poprzetoczeniową u biorcy zwiększającą ryzyko nawrotu choroby nowotworowej, zwłaszcza u pacjentów, którzy nie otrzymują pooperacyjnej chemioterapii jako terapii uzupełniającej po zabiegu [144, 162, 163, 176, 177]. Okołooperacyjne przetaczanie krwinek czerwonych i związana z nim TRIM jest również powiązana ze zwiększoną liczbą nawrotów niektórych guzów litych, takich jak guzy jelita grubego, płuc, wątroby, trzustki i dróg żółciowych [162, 176]. Efekt immunomodulujący zależny od przetoczenia może być specyficzny lub niespecyficzny dla antygeny. W odpowiedzi swoistej dla antygeny pośredniczy tolerancja limfocytów B i T na przetoczone antygeny HLA (*ang. human leucocyte antigen; antygen ludzkich leukocytów*). Współdzielenie HLA między komórkami dawcy i biorcy utrzymuje się u biorcy (stan mikrochimeryzmu), a zatem indukuje specyficzną tolerancję limfocytów B i T, produkcję przeciwciał anti-idiotypowych lub anergię limfocytów B i T. Z drugiej strony, w odpowiedzi niespecyficznej dla antygeny pośredniczą mniej zróżnicowane zmiany w układzie odpornościowym z obniżoną funkcją makrofagów, niższym stosunkiem CD4/CD8 i zmienioną aktywnością komórek NK (*ang. natural killer*). Wszystkie opisane zmiany bezpośrednio lub pośrednio przyczyniają się do zmniejszonego nadzoru immunologicznego, ułatwiają wzrost, proliferację i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych.

Poniżej w Tabeli 4 podsumowano przeprowadzone badania dotyczące wpływu okołooperacyjnego przetoczenia KKCz na pacjentów onkologicznych.

Tabela 4. Przeprowadzone badania dotyczące wpływu okołooperacyjnego przetoczenia KKCz na pacjentów onkologicznych [153].

Autor	Guz pierwotny	Wielkość próby	Rodzaj badania
Lyu i in.	Rak jelita grubego	10 621	Meta-analiza
Woolley i in.	Rak głowy i szyi	143	Meta-analiza
Agnes i in.	Rak żołądka	21 485	Meta-analiza
Boshier i in.	Rak przełyku	4 190	Meta-analiza
Wang i in.	Rak dróg żółciowych	1 719	Meta-analiza
Zhou i in.	Rak dróg żółciowych	605	Retrospektywne
Liu i in.	Rak wątrobowokomórkowy	5 635	Meta-analiza
Mavros i in.	Rak trzustki	4 339	Meta-analiza
Luan i in.	NSCLC	5 915	Meta-analiza
Cata i in.	Rak pęcherza moczowego	15 655	Meta-analiza
Vetterlein i in.	Rak pęcherza moczowego	611	Retrospektywne

Autor	Guz pierwotny	Wielkość próby	Rodzaj badania
Linder i in.	Rak nerki	2 318	Retrospektywne
Park i in.	Rak nerki	3 832	Retrospektywne
Li i in.	Rak prostaty	26 698	Meta-analiza
Poorman i in.	Rak nadnercza	149	Retrospektywne
Bogani i in.	Rak szyjki macicy	275	Retrospektywne
De Oliveira i in.	Rak jajnika	136	Retrospektywne
Warner i in.	Rak jajnika	587	Retrospektywne
Nadeem i in.	Rak piersi	7 384	Meta-analiza

5. Stres oksydacyjny po przetoczeniu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców

Stres oksydacyjny (*ang. OS; oxidative stress*) to stan definiowany jako zaburzenie równowagi pro-oksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku procesów utleniania podczas, którego uszkodzeniom ulegają białka, lipidy, cukry oraz kwasy nukleinowe, co w następstwie prowadzi do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu komórek i tkanek organizmu [178, 179]. Stres oksydacyjny jest zjawiskiem niepożądanym w transfuzjologii, zachodzącym w przechowywanych składnikach krwi, jak również w organizmach biorców po przetoczeniu. Poniżej omówiony został aktualny stan wiedzy na temat dostępnych, nielicznych jeszcze danych literaturowych dotyczących oceny parametrów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców. Dotychczas badania przeprowadzono przed i po przetoczeniu KKCz w grupie wcześniaków [180-183], u pacjentów w stanie krytycznym z oddziałów intensywnej opieki medycznej (OIOM) [184] oraz u pacjentów po wielokrotnych transfuzjach [185-189].

5.1. Pacjenci oddziałów neonatologicznych

Dostępne dane literaturowe wskazują, iż pierwszą grupą biorców KKCz, w której badano zmiany oksydacyjne zachodzące po przetoczeniu były wcześniaki. Sugeruje się, że przetaczanie tego składnika krwi może być przyczyną rozwoju retinopatii (*ang. ROP; retinopathy of prematurity*) i przewlekłej choroby płuc (*ang. CLD; chronic lung disease*) w tej grupie biorców [180]. Czynnikiem, które mogą odpowiadać za rozwój ROP i CLD po przetoczeniu KKCz są wzrost ilości dostarczanego tlenu do siatkówki oka lub płuc, zwiększenie hematokrytu w organizmie biorców, obniżenie powinowactwa tlenu do Hb w przechowywanych krwinkach czerwonych oraz związane z transfuzją przeciążenie żelazem. Krwinki czerwone obecne w przechowywanych jednostkach charakteryzują się skróconym okresem półtrwania, a zawarte w supernatantach KKCz wolne żelazo wykazuje silne działanie prooksydacyjne. Transfuzja kilku jednostek KKCz może znacząco zwiększyć ilość żelaza w organizmie wcześniaków, szczególnie podczas pierwszych tygodni życia, ponieważ przechowywane jednostki zawierają średnio ok. 0,5 mg żelaza/ml [180].

Hirano i wsp. [181] dowiedli, iż stężenie żelaza niezwiązanego z transferyną (NTBI) w osoczu wcześniaków po przetoczeniu KKCz znacznie wzrasta oraz częściowo występuje w formie pro-oksydacyjnej (jon żelazawy, Fe^{2+}). Autorzy jako przyczynę zaobserwowanego

zjawiska podają niską aktywność ferroksydazy oraz redukcję jonu żelazowego (Fe^{3+}) do Fe^{2+} przez kwas askorbinowy [181]. Badania te jednak nie potwierdziły, że NTBI jest na tyle silnym katalizatorem tworzenia RFT, że indukowałoby stres oksydacyjny *in vivo* [181]. W dalszych eksperymentach, przeprowadzonych także w grupie wcześniaków wymagających transfuzji z powodu stwierdzonej niedokrwistości, oznaczano stężenie NTBI w osoczu oraz poziom wybranych markerów stresu oksydacyjnego: całkowitą zawartość wodoronadtlenków (TH) i białkowych grup -SH oraz całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza (TAC) 3 godziny przed i po transfuzji UKKCz [180]. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów w grupie 20 wcześniaków wykazano, iż zawartość NTBI w ich osoczu istotnie wzrasta po 3 godzinach od przetoczenia, aczkolwiek nie jest skorelowana z istotnymi zmianami w poziomie badanych parametrów stresu oksydacyjnego [180]. Sugeruje to, że wzrost stężenia NTBI po przetoczeniu nie jest wystarczający, aby indukować stres oksydacyjny w tej grupie biorców. Jednakże, należy wziąć pod uwagę, że przyczyną takich wyników (i wniosków) mógł być nieodpowiedni (zbyt krótki po przetoczeniu) czas pobrania krwi, który uniemożliwił obserwację zmian badanych markerów stresu oksydacyjnego, na co również zwracają uwagę sami autorzy przedstawionej pracy [180].

Niemniej jednak otrzymane wyniki mogą wskazywać, iż czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój CLD i ROP po przetoczeniu KKCz u wcześniaków może być wtórne przeciążenie żelazem. Zwiększona ilość wolnego żelaza może katalizować reakcję Fentona, w której produkowany jest rodnik hydroksylowy, który z kolei może uszkadzać płuca i siatkówkę oka. Podstawową ochronę przed szkodliwym działaniem wolnego żelaza zapewnia ceruloplazmina (odpowiadająca za utlenianie jonów Fe^{2+} do Fe^{3+}) oraz transferyna (odpowiedzialna za wiązanie Fe^{3+}). Przypuszcza się, iż u wcześniaków (w wieku poniżej 33 tygodnia życia) stężenia wyżej wymienionych białek w osoczu są niskie [180]. Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że przetoczenie KKCz nie zwiększa ryzyka wystąpienia stresu oksydacyjnego w tej grupie biorców [180].

W 2002 roku Wardle i in. [182] oceniali wpływ transfuzji KKCz na poziom peroksydacji lipidów w moczu wcześniaków. Próbkę do badań pobierano trzykrotnie: przed przetoczeniem (1-3 dni), 24 godziny po przetoczeniu KKCz oraz w ciągu następnym ± 7 dni (od 3. do 9. dnia). Przed przetoczeniem stężenie MDA było zbliżone w grupie badanej, której podano KKCz (mediana 9,1 nmol/mg kreatyniny; rozstęp międzykwartyłowy 6,4-12,6 nmol/mg) oraz kontrolnej, w której transfuzji nie przeprowadzono (mediana 11,3 nmol/mg kreatyniny; rozstęp międzykwartyłowy 7,3 – 15,6 nmol/mg). Po 24 godzinach od przetoczenia zaobserwowano istotny wzrost stężenia MDA w moczu (mediana 14,6 nmol/mg kreatyniny;

rozstęp międzykwartyłowy 7,3 – 23,7 nmol/mg), który następnie wracał do poziomu sprzed transfuzji (mediana 10,1 nmol/mg kreatyniny; rozstęp międzykwartyłowy 6,6 – 15,4 nmol/mg) w ciągu ± 6 dni [182]. Na podstawie przeprowadzonych badań dowiedziono, iż stężenie markerów stresu oksydacyjnego może się zmieniać w zależności od czasu pobrania materiału do badań. Sugerowano, że należy brać pod uwagę także inne czynniki, które mogą wpływać na poziom oznaczanych markerów OS, tj. mechaniczna wentylacja [182].

Z kolei Collard i wsp. [183] zaobserwowali u wcześniaków dodatnią korelację pomiędzy objętością przetoczonej krwi, a poziomem MDA w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (*ang. BAL; bronchoalveolar lavage*). Na uzyskane wyniki mógł wpłynąć fakt, iż wcześniaki biorące udział w badaniu były mechanicznie wentylowane oraz wykazywały objawy płucnej infekcji, co mogło nasilać obserwowany efekt [183].

Estońska grupa badawcza oceniała markery OS (pomiar stężenia TBARS, sprzężonych dienów (CD) i potencjał antyoksydacyjny surowicy) przed i po transfuzji wymiennej KKCz w przebiegu sepsy u noworodków [190]. Wybrane parametry oznaczano przed, bezpośrednio po oraz po upływie 6 i 12 godzin od przetoczenia świeżych KKCz. Po transfuzji zaobserwowano znaczący wzrost poziomu CD (zaraz po) i TBARS (po 6 godzinach, przy czym po 12 godzinach poziom TBARS wrócił do poziomu początkowego sprzed przetoczenia). Przedstawione wyniki po raz kolejny podkreślają tymczasowy charakter zmian niektórych parametrów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu krwi [190]. Najnowsze dostępne wyniki badań Boskabadi i in. [191] wskazują, iż transfuzja wymienna u noworodków z żółtaczką wpływa na równowagę prooksydacyjno-antyoksydacyjną w kierunku procesów utleniania oraz nasila się nawet do 6 godzin po przetoczeniu.

5.2. Pacjenci oddziałów intensywnej opieki medycznej (OIOM)

Przetaczanie KKCz jest powszechnie stosowaną procedurą u pacjentów przebywających na Oddziałach Intensywnej Opieki Medycznej (OIOM), u których wystąpiła niedokrwistość. Badania epidemiologiczne prowadzone w ostatnich latach wykazały, że podczas pobytu na OIOM ok. 37% pacjentów otrzymuje KKCz (średnio pięć jednostek). Natomiast, u pacjentów, którzy przebywają na oddziale dłużej niż 7 dni, ilość ta zwiększa się do 73% [184]. Na podstawie uzyskanych danych dowiedziono także, że u pacjentów krytycznie chorych zwiększony poziom stresu oksydacyjnego związany jest z gorszym rokowaniem. Badania wykonane przez Rosa i in. [184] w grupie 40 biorców, wykazały, że po przetoczeniu KKCz wzrasta poziom grup karbonylowych białek i peroksydacji lipidów

(oceniany poprzez pomiar TBARS) przy jednoczesnym obniżeniu poziomu interleukiny 6 (IL-6). Próbki krwi od pacjentów pobierano tuż przed i 12 godzin po transfuzji. Dodatkowo, zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy zwiększoną śmiertelnością pacjentów, a przetoczeniowym oksydacyjnym uszkodzeniem białek. Podsumowując, w badanej grupie biorców przetoczenie KKCz może mieć poważne negatywne skutki kliniczne [184].

5.3. Pacjenci po wielokrotnych transfuzjach

Ryzyko wystąpienia poważnych reakcji przetoczeniowych jest znacznie większe u pacjentów po wielokrotnych transfuzjach. Pacjenci cierpiący na schorzenia, tj. przewlekła białaczka szpikowa, syndrom mielodysplastyczny, niedokrwistość aplastyczna oraz talasemia, z powodu przewlekłej niedokrwistości, wymagają terapii polegającej na systematycznym przetaczaniu KKCz. Ta grupa biorców w największym stopniu narażona jest, m.in. na przewlekłą hemosyderozę, alloimmunizację, wystąpienie zakażenia przenoszonego przez krew czy reakcji gorączkowych [185].

Chattopadhyay i in. [185] zaobserwowali znacząco podwyższone stężenie MDA i ferrytyny w surowicy krwi oraz obniżoną oporność osmotyczną erytrocytów u biorców ze schorzeniami hematologicznymi, którzy wymagają wielokrotnych transfuzji KKCz, w porównaniu do grupy kontrolnej [185]. Pacjenci z β -talasemią i anemią sierpowatą są narażeni na poważne przeciążenie żelazem, w związku z tym, iż są przewlekle leczeni koncentratami czerwonekrwinkowymi, co skutkuje zwiększonym poziomem stresu oksydacyjnego, przejawiającym się peroksydacją lipidów, która prowadzi do uszkodzenia wątroby [186, 187].

W 2014 roku Fernandes i wsp. [188] badali chorych na niedokrwistość w zależności od ilości przetoczonych KKCz. W pierwszej grupie znaleźli się biorcy, którym przetoczono poniżej pięciu jednostek, w drugiej między 5 a 10, a w trzeciej powyżej dziesięciu preparatów czerwonekrwinkowych. W porównaniu do grupy kontrolnej, we wszystkich trzech grupach biorców zaobserwowano wzrost poziomu TBARS i zwiększoną karbonylację białek oraz dodatkowo istotny spadek stężenia grup tiolowych u pacjentów, którym przetoczono więcej niż dziesięć jednostek. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych (CAT, SOD, GPx) ujemnie korelowała z liczbą otrzymanych KKCz. Przedstawione wyniki potwierdzają, że wzrost ilości przetoczonych KKCz związany jest ze wzrostem poziomu OS [188].

Dwa lata później w eksperymentach zaprojektowanych w podobny sposób, w żadnej

z badanych grup nie zaobserwowano zmian w poziomie methemoglobiny w próbkach pobranych od 34 pacjentów przed i po zabiegu chirurgicznym [192]. W tych badaniach do pierwszej grupy przydzielono pacjentów, którym nie zlecono transfuzji KKCz, w drugiej oraz trzeciej grupie znajdowali się biorcy, którym przetoczono, odpowiednio, 1-3 oraz 4 i więcej jednostek KKCz. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że wzrost niektórych parametrów OS obserwowany po przetoczeniu KKCz może mieć charakter przejściowy. Prawdopodobnie, kliniczne skutki zaobserwowanego OS mogą być zauważalne u biorców wielokrotnych transfuzji [192].

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

6. Uzasadnienie podjęcia tematu

Wskazaniem do przetoczenia krwinek czerwonych jest znaczna niedokrwistość zagrażająca niedotlenieniem ważnych dla życia narządów. Transfuzja KKCz jest zabiegiem ratującym życie, ale zawsze niesie za sobą ryzyko powikłań, których przyczyny często nie są znane.

Obecnie, w ośrodkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa maksymalny czas przechowywania KKCz, w warunkach chłodniczych ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) i z dodatkiem określonych płynów konserwujących/wzbogacających, wynosi 42 dni. Rygorystyczne wymogi kontroli jakości składników krwi, do których należy okres ich przydatności do użytku klinicznego zapewniają względne bezpieczeństwo. Jednak w przechowywanych krwinkach czerwonych zachodzą zależne od czasu odwracalne i nieodwracalne zmiany w ich strukturze, metabolizmie i funkcji. Dane eksperymentalne wskazują, że zmiany te mogą mieć wpływ na skuteczność przetoczenia krwinek *in vivo* oraz wystąpienie niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych u zwierząt laboratoryjnych. Wiele przeprowadzonych badań sugeruje, że transfuzja „starszych” (przechowywanych ponad 14 dni) KKCz, szczególnie pacjentom ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi, może być przyczyną zwiększonego ryzyka powikłań zatorowo-zakrzepowych, a także, m.in. potransfuzyjnego ostrego uszkodzenia płuc, niewydolności wielonarządowej, czy posocznicy, a nawet zwiększonej śmiertelności. Podłożem tych reakcji mogą być liczne, biologicznie aktywne związki (m.in. pozakomórkowa Hb, hem, żelazo, cytokiny, czynniki wzrostu), a także mikrocząstki (wykazujące aktywność pro koagulacyjną), akumulujące się w dłużej przechowywanych KKCz. Związki uwalniane z komórek do supernatantu KKCz podczas przechowywania, wśród których są, m.in. mediatory pro-zapalne, pro-nowotworowe, angiogenne, czy wazoaktywne, jak i mechanizmy ich oddziaływania z komórkami krwi biorcy są bardzo słabo poznane.

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem niepożądanym w transfuzjologii. W przechowywanych KKCz na skutek wzrostu poziomu RFT, przy jednoczesnym upośledzeniu systemu antyoksydacyjnego, dochodzi do stresu oksydacyjnego. Nasilenie stresu oksydacyjnego, jak również poziom żelaza niezwiązanego z transferyną rosną proporcjonalnie do czasu przechowywania KKCz, co stwarza pro-oksydacyjne środowisko. Progresywne zmiany zachodzące w krwinkach czerwonych podczas ich przechowywania w ośrodkach krwiodawstwa i krwiolecznictwa są dobrze opisane i udokumentowane, natomiast kliniczne konsekwencje przetaczania KKCz, szczególnie dłużej przechowywanych (z zaakceptowaną datą ważności do 42 dni), nie zostały dotychczas wyjaśnione. Nie wyjaśniono także

czy przetaczanie filtrowanych KKCz, w celu usunięcia z nich większości krwinek białych i płytek krwi dawcy, zmniejsza ryzyko reakcji poprzetoczeniowych u biorców. Dużą trudnością we właściwej interpretacji wyników badań klinicznych jest fakt, że na zachorowalność i śmiertelność biorców, oprócz czasu przechowywania przetaczanego składnika krwi, ma wpływ wiele różnorodnych czynników, których nie da się wyeliminować.

Koncentraty krwinek czerwonych (KKCz) są najczęściej przetaczanym składnikiem krwi, a spośród biorców, koncentratem czerwonokrwinkowym najczęściej leczeni są pacjenci z nowotworami krwi. U chorych na ostrą białaczkę szpikową (*ang. AML; Acute Myeloid Leukemia*) istotnym problemem klinicznym są wynikające z nacieczenia szpiku kostnego niedokrwistość, małopłytkowość oraz neutropenia. W leczeniu głębokiej niedokrwistości (stężenie hemoglobiny poniżej 7 g/dl) czy małopłytkowości (liczba płytek krwi poniżej 20 G/l), poza terapią choroby podstawowej stosuje się przetoczenia KKCz i/lub koncentratu krwinek płytkowych (KKP). Nieliczne dane literaturowe wskazują, że w niektórych grupach biorców (w grupie wcześniaków, pacjentów w stanie krytycznym z oddziałów intensywnej opieki medycznej (OIOM), pacjentów po wielokrotnych transfuzjach) po przetoczeniu KKCz obserwuje się wzrost wybranych parametrów stresu oksydacyjnego. W procesie kancerogenezy oraz przerzutowania istotną rolę odgrywa zaburzona równowaga oksydacyjno-antyoksydacyjna. U pacjentów z chorobami nowotworowymi zaobserwowano znacznie podwyższony poziom stresu oksydacyjnego w porównaniu do zdrowych ochotników. Obecnie brak w literaturze danych dotyczących badania stężenia markerów stresu oksydacyjnego przed i po przetoczeniu składników krwi u chorych na ostrą białaczkę szpikową.

7. Założenia i cel badań

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było ustalenie czy postępujące zmiany zachodzące w długo przechowywanych KKCz (42 dni ustalone jako dopuszczalna norma) promują ich działanie pro-koagulacyjne, pro-oksydacyjne oraz modulujące przeżywalność i proliferację komórek nowotworowych, a także jaki jest wpływ leukoredukcji na te procesy. Celem pracy była także ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu KKCz u chorych na ostre białaczki szpikowe.

Podstawą hipotezy badawczej było założenie, że supernatanty z przechowywanych przez 42 dni KKCz, w szczególności z niefiltrowanych jednostek wykazują działanie pro-zakrzepowe, pro-oksydacyjne oraz że mogą one wzmacniać proliferację komórek nowotworowych.

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej zostały podzielone na trzy cele szczegółowe (zadania badawcze):

- 1) ocena parametrów czynnościowych płytek krwi w krwi pełnej po uprzedniej inkubacji z supernatantami (izolowanymi z KKCz oraz UKKCz w 1. oraz 42. dniu przechowywania) poprzez określenie:
 - stanu aktywacji płytek krwi (stopnia pobudzenia) - (cytometryczna analiza udziału frakcji mikroplatek i agregatów płytkowych, pomiar ekspresji antygeny miejsca wiążącego fibrynogen w kompleksie GP IIb/IIIa oraz selektyny P)
 - zmian reaktywności płytek krwi w odpowiedzi na działanie fizjologicznych agonistów (pomiar odsetka mikroplatek i agregatów płytkowych, selektyny P i aktywnej formy GP IIb/IIIa w krwi pełnej, pomiar agregacji płytek krwi w osoczu bogato płytkowym i adhezji płytek krwi zawieszonych w buforze Tyroda)
- 2) ocena działania supernatantów (izolowanych z KKCz oraz UKKCz w 1. oraz 42. dniu przechowywania) na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych (i linii nienowotworowej) poprzez określenie ich:
 - cytotoksyczności wobec badanych komórek (pomiar przeżywalności)
 - wpływu na proliferację badanych komórek
 - genotoksyczności (pomiar poziomu uszkodzeń DNA)
 - właściwości pro-oksydacyjnych (pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu RFT)
 - właściwości pro/anty-apoptotycznych (na podstawie pomiaru aktywności kaspazy 3/7 oraz kaspazy 9)

3) ocena wybranych markerów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych lub koncentratu krwinek płytkowych u chorych na ostre białaczki szpikowe (AML) poprzez pomiar (w osoczu krwi, pobranej przed i 24 godziny po przetoczeniu składnika krwi):

- stężenia grup tiolowych (-SH)
- stężenia grup karbonylowych (-CO)
- stężenia 3-nitrotyrozyny (3-NT)
- aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), transferazy glutationowej (GST)
- poziomu peroksydacji lipidów (TBARS)
- całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA)
- stężenia końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE)
- aktywności zewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji ds. Bioetyki Badań Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego 7/KBBN-UŁ/III/2014 oraz 26/KBBN-UŁ/I/2017. Badania prowadzone na materiale biologicznym pochodzącym od pacjentów przebywających w Wojewódzkim Wielospecjalistycznym Centrum Onkologii i Traumatologii im. Mikołaja Kopernika w Łodzi zostały wykonane zgodnie z Deklaracją Helsińską oraz uchwałą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi RNN/19/17/KE.

8. Materiały

8.1. Materiał badawczy

Materiał biologiczny do badań stanowiły:

- krew pełna pobrana od zdrowych dawców (zakwalifikowanych) do pojemnika z roztworem CPD (*ang. Citrate-Phosphate-Dextrose*) oraz świeżo przygotowane koncentraty krwinek czerwonych w roztworze wzbogacającym (*ang. SAGM; Saline-Adenine-Glucose-Mannitol*) uzyskiwane z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Łodzi
- krew pełna uzyskana od zdrowych ochotników pobrana w Diagnostyka Sp. z o. o. Laboratoria medyczne (Centrum Medyczne im. dr. L. Rydygiera) oraz Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej (ul. Jaracza 85 w Łodzi)
- osocze pochodzące od 52 pacjentów z ostrą białaczką szpikową przebywających w Klinice Hematologii Wojewódzkiego Wielospecjalistycznego Centrum Onkologii i Traumatologii (WWCOiT) im. Mikołaja Kopernika w Łodzi
- linie ludzkich komórek nowotworowych:
 - K-562 (ATCC® CCL-243™) – przewlekłej białaczki szpikowej (CML)
 - LoVo (ATCC® CCL-229™) – gruczolakoraka jelita grubego
 - MCF7 (ATCC® HTB-22™) – gruczolakoraka piersi
 - A2780 (ECACC 93112519) – raka jajnika
 - PC-3 (ATCC® CRL-1435™) – gruczolakoraka prostaty
- nienowotworowa, unieśmiertelniona linia ludzkich komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego – MCF-10A (ATCC® CRL-10317™)

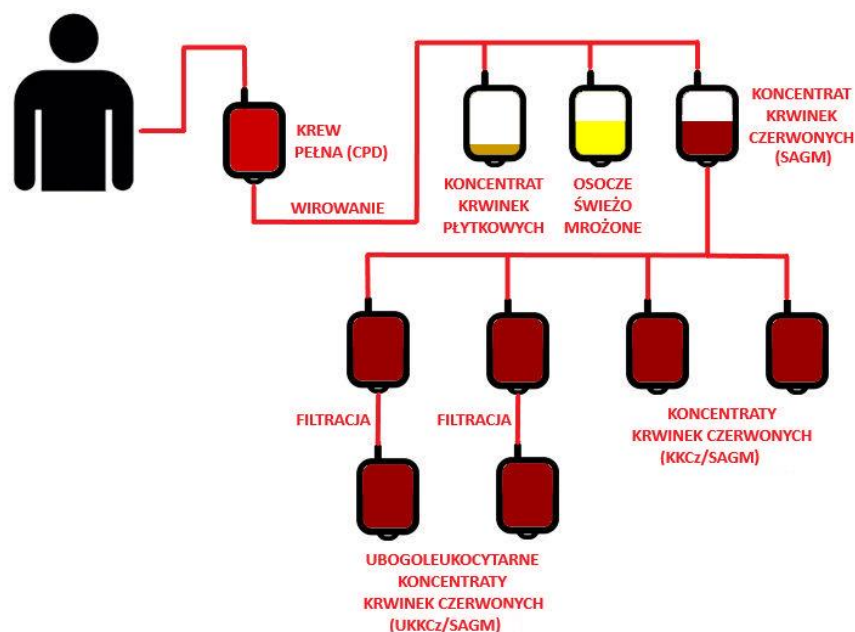
Komórki linii A2780 zakupiono w European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC; Porton Down, Salisbury, Wielka Brytania), natomiast pozostałe linie w American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, Stany Zjednoczone).

8.1.1. Koncentraty krwinek czerwonych (KKCz)

Do badań wykorzystano 5 komercyjnych koncentratów krwinek czerwonych (2 jednostki gr. AB RhD⁺, 2 jednostki gr. B RhD⁺, jedna jednostka gr. 0 RhD⁻) z roztworem wzbogacającym SAGM (150 mM chlorek sodu; 1,25 mM adenina; 45 mM glukoza; 30 mM

mannitol). W RCKiK każdy koncentrat krwinek czerwonych (KKCz/SAGM) był podzielony na 4 równe wagowo porcje pediatryczne, z których dwie pozostawiano niefiltrowane, a dwie poddawano filtracji (zestaw BioR Flex, Fresenius Kabi AG filter; Bad Homburg, Niemcy) w celu otrzymania ubogoleukocytarnego koncentratu krwinek czerwonych (UKKCz/SAGM) (Rycina 13). Z jednostek KKCz i UKKCz, w 1. i 42. dniu przechowywania w warunkach chłodniczych ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) otrzymywano supernatanty.

Medyczne zasady kwalifikowania dawców, pobierania krwi, wytwarzania jej składników oraz kontrolę ich jakości przeprowadzano zgodnie z obowiązującymi podstawami prawnymi (dyrektywa 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dn. 27 stycznia 2003 roku, Rozporządzenie Ministra Zdrowia - ustawa o publicznej służbie krwi z dn. 22 sierpnia 1997 roku wraz z późniejszymi zmianami i aktami wykonawczymi, zalecenia Rady Europy Strasburg 2011).



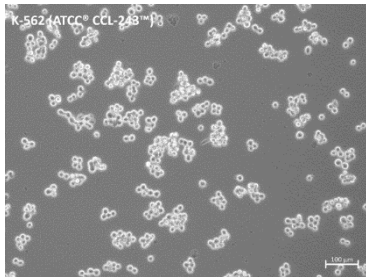
Rycina 13. Preparatyka jednostek KKCz wykorzystanych w badaniach wykonana na zamówienie w RCKiK (opracowanie własne)

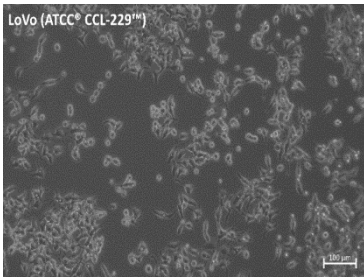
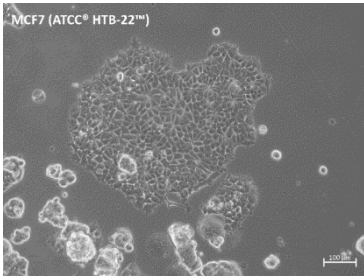
W RCKiK zabieg pobierania jednej jednostki krwi pełnej ($450\text{ ml} \pm 10\%$) od zdrowego dawcy przeprowadza się używając sterylnych i apirogennych zestawów pojemników stanowiących układ zamknięty (CompoFlex[®], Fresenius Kabi AG; Bad Homburg, Niemcy), wykonanych z polichlorku winylu (*ang.* PVC; *polyvinyl chloride*) z dodatkiem plastyfikatora ftalanu di-2-etyloheksylu (*ang.* DEHP; *di-2-ethylhexyl phthalate*), zawierających ok. 70 ml płynu konserwującego CPD (100 mM cytrynian sodu; 18 mM diwodorofosforan sodu; 130 mM glukoza; 16 mM kwas cytrynowy - zgodny z Farmakopeą Europejską).

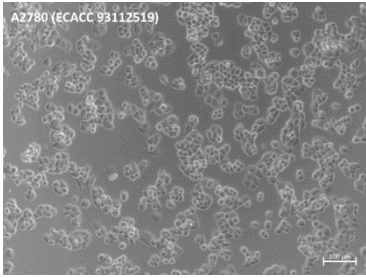
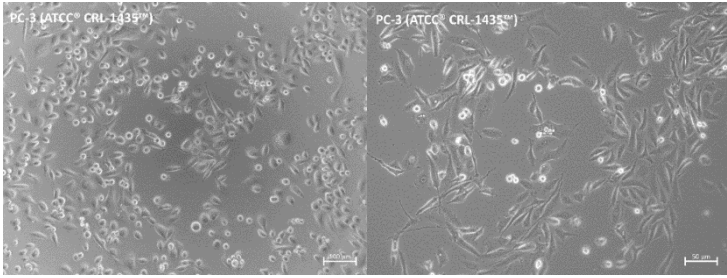
Następnie, zgodnie z przyjętymi zasadami preparatyki krwi i jej składników z jednej jednostki krwi pełnej po usunięciu 90% osocza otrzymuje się jedną jednostkę koncentratu krwinek czerwonych w roztworze wzbogacającym SAGM (KKCz/SAGM). Otrzymana jednostka oprócz krwinek czerwonych zawiera także krwinki płytkowe i białe w ilości zależnej od zastosowanych warunków wirowania (ilość białych krwinek powyżej $1,2 \times 10^9$ /jednostkę). Składniki zawarte w płynie SAGM zapobiegają hemolizie, wspomagają przebieg procesu glikolizy, zapewniają utrzymanie odpowiedniej osmolarności oraz żywotności krwinek czerwonych po transfuzji. Zastosowanie roztworu uzupełniającego umożliwia przechowywanie KKCz przez 42 dni w temperaturze $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Kolejnym etapem preparatyki był podział w układzie zamkniętym jednej jednostki KKCz/SAGM na cztery równe porcje do użytku pediatrycznego (worki JMS Singapore Pte Ltd). Dwa worki pediatryczne były poddane procesowi filtracji grawitacyjnej przy użyciu filtrów antyleukocytarnych (zestaw BioR Flex, Fresenius Kabi AG filter; Bad Homburg, Niemcy) w celu otrzymania ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych (UKKCz/SAGM; ilość krwinek białych poniżej $1,0 \times 10^6$ /jednostkę). Opisaną powyżej preparatykę (Rycina 13) wykonywano zaraz po zakończeniu donacji. Tak przygotowane jednostki odbierano z RCKiK w Łodzi.

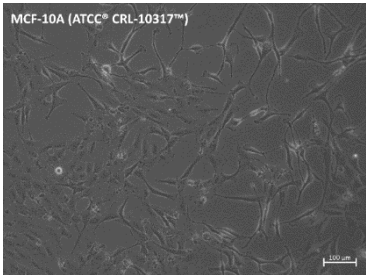
8.1.2. Charakterystyka linii komórkowych

Tabela 5. Specyfikacja linii komórkowych wykorzystanych do badań

Linia K-562 (ATCC® CCL-243™)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie/tkanka	szpik kostny
Morfologia	limfoblast
Typ wzrostu komórek	wzrost w hodowli zawiesinowej (linia komórek zawiesinowych)
Choroba	przewlekła białaczka szpikowa (<i>ang. chronic myelogenous leukemia; CML</i>)
Dane kliniczne (płeć, wiek)	kobieta, 53 lata
Pochodzenie	komórki metastazy (wysięku opłucnowego) 53-letniej kobiety z przewlekłą białaczką szpikową pobrane w fazie przełomu blastycznego
Nowotworowość	tak
Zdjęcie*	

Linia LoVo (ATCC® CCL-229™)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie/tkanka	jelito grube; pochodząca z miejsca przerzutowego: okolica nadobojczykowa po stronie lewej
Morfologia	typ nabłonkowy
Typ wzrostu komórek	wzrost w postaci monowarstwy (linia komórek adherentnych)
Choroba	gruczolakorak jelita grubego, klasyfikacja Dukes'a typ C, stopień IV
Dane kliniczne (płeć, wiek)	mężczyzna rasy kaukaskiej, 56 lat
Pochodzenie	wyprowadzona w 1971 roku z fragmentu guza przerzutowego w okolicy nadobojczykowej po stronie lewej 56-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej z histologicznie potwierdzonym rozpoznaniem gruczolakoraka okrężnicy
Nowotworowość	tak
Zdjęcie*	
Linia MCF7 (ATCC® HTB-22™)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie/tkanka	gruczoł sutkowy, piersć; pochodząca z miejsca przerzutowego: wysięk opłucnowy
Morfologia	typ nabłonkowy
Typ wzrostu komórek	wzrost w postaci monowarstwy (linia komórek adherentnych)
Choroba	estrogenozależny gruczolakorak gruczołu piersiowego
Dane kliniczne (płeć, wiek)	kobieta rasy kaukaskiej, 69 lat
Pochodzenie	komórki metastazy (wysięku opłucnowego) 69-letniej kobiety rasy kaukaskiej cierpiącej na gruczolakoraka gruczołu piersiowego, linia wyprowadzona w 1970 roku
Nowotworowość	tak
Zdjęcie*	
Linia A2780 (ECACC 93112519)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie/tkanka	jajnik; płyn puchlinowy (wodobrzusze, puchlina brzuszna)

Morfologia	typ nabłonkowy
Typ wzrostu komórek	wzrost w postaci monowarstwy (linia komórek adherentnych)
Choroba	endometrialny gruczolakorak jajnika
Dane kliniczne (płeć, wiek)	kobieta, brak danych dotyczących wieku pacjentki
Pochodzenie	wyprowadzona w 1984 roku z płynu puchlinowego od nieleczzonej pacjentki cierpiącej na endometrialnego gruczolakoraka jajnika (komórki nie były narażone na działanie żadnych leków przeciwnowotworowych)
Nowotworowość	tak
Zdjęcie*	
Linia PC-3 (ATCC® CRL-1435™)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie/tkanka	prostata; pochodząca z miejsca przerzutowego: kość
Morfologia	typ nabłonkowy
Typ wzrostu komórek	wzrost w postaci monowarstwy (linia komórek adherentnych)
Choroba	gruczolakorak gruczołu krokowego, stopień IV
Dane kliniczne (płeć, wiek)	mężczyzna rasy kaukaskiej, 62 lata
Pochodzenie	wyprowadzona z przerzutów do kości od 62-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej cierpiącego na gruczolakoraka prostaty stopnia IV
Nowotworowość	tak
Zdjęcie*	
Linia MCF-10A (ATCC® CRL-10317™)	
Organizm	<i>Homo sapiens</i> , człowiek
Pierwotne usytuowanie/tkanka	gruczoł sutkowy; pierś
Morfologia	typ nabłonkowy
Typ wzrostu komórek	wzrost w postaci monowarstwy (linia komórek adherentnych)
Choroba	zwlóknienie gruczołu piersiowego
Dane kliniczne (płeć, wiek)	kobieta rasy kaukaskiej, 36 lat

Pochodzenie	wyprowadzona w 1984 roku z nienowotworowych komórek nabłonka gruczołu piersiowego 36-letniej kobiety rasy kaukaskiej chorującej na zwłóknienie gruczołu piersiowego (unieśmierteliona linia komórkowa)
Nowotworowość	nie
Zdjęcie*	 <p>MCF-10A (ATCC® CRL-10317™)</p>

*Zdjęcia reprezentatywne przedstawiające morfologię komórek wykorzystanych w doświadczeniach wykonano przy pomocy mikroskopu świetlnego kontrastowo-fazowego o odwróconej optyce model Primo Vert firmy Carl Zeiss z kamerą AxioCam 105 color (autorstwa K. Czubak-Prowizor).

8.1.3. Charakterystyka badanych grup pacjentów

Materiał biologiczny do realizacji trzeciego zadania badawczego stanowiło osocze pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowaną ostrą białaczką szpikową oraz od zdrowych dawców. Wszyscy uczestnicy projektu wyrazili dobrowolną, świadomą, pisemną zgodę na udział w eksperymencie po zapoznaniu się z celem i zasadami przeprowadzenia doświadczenia medycznego. W związku z tym, iż badania prowadzone były na materiale pochodzenia ludzkiego, jakim jest osocze, nie przewidziano niepożądanych skutków oraz korzyści leczniczych bezpośrednio dla dawców.

Grupa badana

Grupa badana rekrutowana była spośród chorych na AML, zdiagnozowanych na podstawie kryteriów diagnostycznych klasyfikacji WHO z 2008 roku, hospitalizowanych w Klinice Hematologii WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w okresie od marca 2017 roku do grudnia 2018 roku. Pacjentów kwalifikowano do udziału w analizach na podstawie opracowanego wcześniej protokołu badania, który obejmował kryteria włączenia i wyłączenia z projektu.

Kryteria włączenia do badania:

- rozpoznanie ostrej białaczki szpikowej na podstawie kryteriów diagnostycznych klasyfikacji WHO z 2008 roku
- wiek powyżej 18 lat
- stan ogólny 0-3 w skali ECOG (skala sprawności według *Eastern Cooperative Oncology Group* – określa stan ogólny oraz jakość życia pacjenta z chorobą nowotworową)

- podpisanie świadomej zgody na udział w badaniu

Kryteria wyłączenia z badania:

- niewydolność nerek (GFR < 30 ml/min)
- uszkodzenie wątroby: stężenie ALT, AST – 3 × górna granica normy
- choroby autoimmunologiczne, zaburzenia endokrynologiczne, inne nowotwory złośliwe
- stan ogólny 4 wg. skali ECOG

W ramach badania wzięło udział 52 pacjentów, u których rozpoznano ostrą białaczkę szpikową: 27 pacjentom przetoczono Napromieniowany Ubogoleukocytarny Koncentrat Krwinek Czerwonych (NUKKCz), a 25 podano Napromieniowany Ubogoleukocytarny Koncentrat Krwinek Płytkowych (NUKKP). W dalszej części pracy dla uproszczenia zapisu będą stosowane, odpowiednio następujące skróty: KKCz (dla NUKKCz) oraz KKP (dla NUKKP). Krew pełną od pacjentów włączonych do badania pobierano do próbek S-Monovette® (Sarstedt; Nümbrecht, Niemcy) z 3,2% roztworem cytrynianu trójsodowego (w stosunku krwi do cytrynianu 9:1) dwukrotnie, tuż przed (około 30 minut) oraz 24 godziny po przetoczeniu składnika krwi. Następnie niezwłocznie w Pracowni Serologii przy WWCOiT im. Mikołaja Kopernika w Łodzi próbki krwi pełnej wirowano (10 min, 1 800 × g, 20°C) w celu uzyskania osocza cytrynianowego. Każdą próbkę osocza porcjowano, zamrażano w temperaturze -32°C i przechowywano w tej temperaturze do czasu wykonania oznaczeń. Średnia wieku badanych osób wynosiła 57,1±11,3 lat, natomiast mediana 59 lat. Wiek pacjentów wahał się w granicach od 26 do 89 lat. Pacjentom podczas hospitalizacji nie podawano substancji o właściwościach antyoksydacyjnych. Szczegółową charakterystykę pacjentów, którzy wzięli udział w badaniu przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Charakterystyka pacjentów uczestniczących w badaniu

Przetoczony składnik krwi	KKCz	KKP
Ilość pacjentów	27	25
Wiek [lata; mediana i zakres]	59 (26 – 74)	58 (37 – 89)
Płeć [♀/♂]	10/17	13/12
Ilość przetoczonych jednostek (jedenorazowo)	2 jednostki (ok. 500 ml)	1 jednostka (ok. 50 ml)
„Wiek” składnika [dni; mediana i zakres]	6,00 (2,00 – 26,00)	3,00 (1,00 – 5,00)

Przetoczony składnik krwi		KKCz	KKP
Płytki krwi [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	przed	30,00 (4,00 – 256,00)	12,00 (3,00 – 35,00)
	po	29,00 (3,00 – 226,00)	36,00 (2,00 – 88,00)
Hemoglobina [mg/dl]	przed	7,50 (6,20 – 8,90)	8,40 (7,20 – 10,90)
	po	8,60 (6,90 – 91,00)	8,30 (6,5 – 10,5)
Krwinki czerwone [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	przed	2,39 (1,85 – 2,95)	2,86 (2,24 – 3,49)
	po	2,85 (2,15 – 3,43)	2,82 (2,12 – 3,56)
Krwinki białe [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	przed	0,78 (0,03 – 135,48)	0,49 (0,07 – 27,16)
	po	0,66 (0,03 – 86,27)	0,64 (0,08 – 19,20)
INR*	przed	1,23 (0,89 – 1,41)	1,20 (0,92 – 1,91)
	po	1,23 (0,90 – 1,38)	1,19 (0,88 – 1,54)
APTT [s]	przed	31,90 (22,70 – 49,70)	32,90 (24,30 – 54,00)
	po	31,15 (22,80 – 51,30)	32,30 (24,50 – 53,50)
Fibrynogen [mg/dl]	przed	375,00 (190,00 – 850,00)	351,00 (128,00 – 804,00)
	po	324,00 (176,00 – 894,00)	326,00 (156,00 – 778,00)
Ferrytyna [ng/ml]	przed	1774,50 (688,70 – 7666,00)	1170,00 (199,60 – 1329,00)
	po	1720,00 (671,00 – 4957,00)	1185,00 (173,50 – 2260,00)
CRP [mg/l]	przed	31,40 (1,00 – 386,90)	39,32 (1,97 – 306,90)
	po	32,61 (1,00 – 483,33)	33,80 (2,08 – 313,20)
Infekcja (nie/tak)		16/11	10/15
Cukrzyca (nie/tak)		25/2	23/2
Nikotynizm (nie/tak)		24/3	22/3
POCHP (nie/tak)		26/1	25/0
Astma (nie/tak)		26/1	24/1
Nadciśnienie (nie/tak)		15/12	16/9
Rozpoznanie (AML/nawrót)		26/1	25/0

Wartości oznaczanych parametrów przedstawiono jako mediany (zakres wartości). *INR – znormalizowany czas protrombinowy (norma: 0,8 – 1,2).

Grupa kontrolna

Grupa kontrolna obejmowała 43 zdrowych ochotników, którzy oddali krew pełną (próbówki S-Monovette[®] CPDA₁; ang. *Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine*) w punkcie pobrań w Centrum Medycznym im. dr. L. Rydygiera w Łodzi lub Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej (ul. Jaracza 85 w Łodzi). Wiek pacjentów z grupy kontrolnej i badanej był zbliżony. Średnia wieku grupy kontrolnej wynosiła $54,5 \pm 9,5$ lat, natomiast mediana 55 lat. Wiek pacjentów zakwalifikowanych wahał się w granicach od 22 do 71 lat. Kobiety stanowiły około 45% tej grupy, mężczyźni pozostałe 55%. U pacjentów tych nie zdiagnozowano chorób przewlekłych, ani innych schorzeń mogących wpłynąć na wyniki pomiarów badanych parametrów stresu oksydacyjnego. Grupa badana pacjentów z grupą kontrolną były porównywalne (jednorodne) pod względem wieku oraz płci.

8.2. Odczynniki chemiczne

Tabela 7. Odczynniki chemiczne zastosowane w badaniach

Odczynniki chemiczne
Odczynniki do hodowli komórek
<ul style="list-style-type: none"> - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): cisplatyna; RPMI-1640 medium z L-glutaminą; roztwór ludzkiej rekombinowanej insuliny; antybiotyki penicylina i streptomycyna; - Biowest (Nuaille, Francja): termicznie inaktywowana płodowa surowica bydlęca (FBS); trypsyna-EDTA; - Lonza (Basel, Szwajcaria): medium DMEM z 4,5 g/L glukozą i L-glutaminą; medium DMEM:F12; medium MEGM™ Mammary Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™; - Biological Industries (Cromwell, USA): DPBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺; bufor HBSS bez czerwieni fenolowej; PBS;
Przeciwciała
<ul style="list-style-type: none"> - Becton-Dickinson (Franklin Lakes, USA): anty-CD61/PerCP; anty-CD61/PE; anty-CD61/FITC; anty-CD62/PE; PAC-1/FITC; kontrole izotypowe; anty-CD235a (glikoforyna A); - Abcam (Cambridge, Wielka Brytania): kozie monoklonalne przeciwciała anty-nitrotyrozynowe (anty-NT); streptawidyna skompleksowana z biotynylowaną peroksydazą chrzanową (Strept/HRP); - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): królicze przeciwciała anty-DNPH; anty-królicze przeciwciała skompleksowane z peroksydazą chrzanową (HRP); - Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA): królicze anty-kozie poliklonalne biotynylowane immunoglobuliny IgG;
Komercyjne zestawy odczynników
<ul style="list-style-type: none"> - Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA): Pierce™ BCA Protein Assay Kit; - Cell Biolabs (San Diego, USA): Oxiselect™ Advanced Glycation End Product (AGE) Competitive ELISA Kit; - Promega (Madison, USA): Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay; Caspase-Glo® 9 Assay; - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): SOD Determination Kit; Cell Counting Kit-8 (CCK-8); Cell Proliferation ELISA - BrdU colorimetric Kit (Roche); - BioAssay Systems (Hayward, USA): QuantiChrom™ Heme Assay Kit; QuantiChrom™ Iron Assay Kit;
Pozostałe odczynniki
<ul style="list-style-type: none"> - Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB); 5-amino-2,3-dihydroftalazyn-1,4-dionu (luminol); aceton; agarozą LMP (o niskiej temperaturze topnienia); agarozą NMP (o normalnej temperaturze topnienia); albumina surowicy bydlęcej (BSA); błękit trypanu; chlorowodorek guanidyny; dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI); dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH); dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (H₂DCF-DA); glutałdehyd; Histopaque®-1077; jonofor wapnia; kakodylan sodu; kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS); kwas 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB); kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy (Trolox); kwas barbiturowy (TBA); kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA); kwas p-hydroksykumarowy; kwas tiobarbiturowy (TBA); kwas trichlorooctowy (TCA); odczynnik Bradford; pirogronian sodowy; substrat SigmaFast™ OPD; Triton™ X-100; trombina; Tween® 20; zredukowany glutation (GSH); - Chrono-Log Corporation (Havertown, USA): kolagen typu I; ADP; - Promega (Madison, USA): inhibitor kaspaz Z-VAD-FMK; - Aqua-Med (Łódź, Polska): odczynnik Drabkina; - Bio-Rad (Hercules, USA): Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; - Fresenius Kabi Polska (Kutno, Polska): płyn wzbogacający SAGM; - DIAGON (Budapeszt, Węgry): odczynniki do oznaczeń koagulometrycznych; - Becton – Dickinson (Franklin Lakes, USA): CellFIX; - POCH (Gliwice, Polska): H₂O₂; NaH₂PO₄; Na₂HPO₄; NaCl; KCl; glukozą; CaCl₂; NaHCO₃; MgCl₂; etanol; HCl; NaOH; metanol; glicyna; DMSO; SDS; Tris; H₂SO₄; octan etylu; NaClO; NaBH₄;

8.3. Aparatura

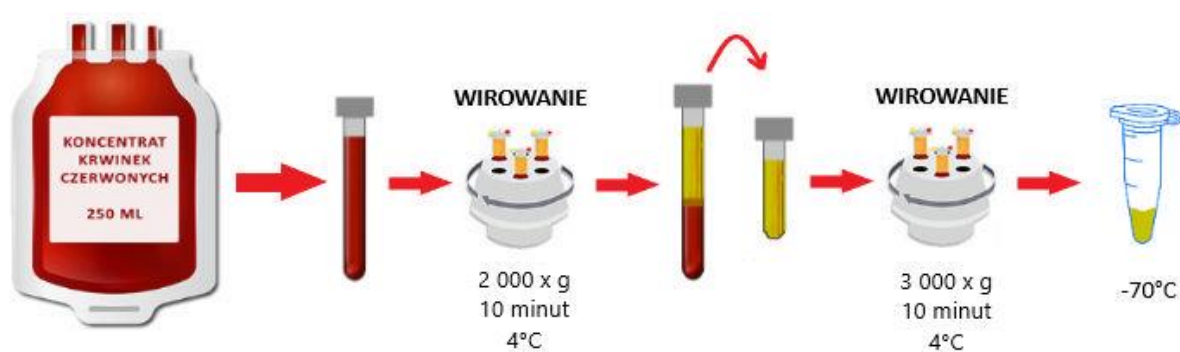
- agregometr dwukanałowy model 490 firmy Chrono-Log[®] (Havertown, Stany Zjednoczone)
- aparat do elektroforezy kometowej model CSL-COM20 firmy Cleaver Scientific Ltd. (Rugby, Wielka Brytania)
- aparaty do elektroforezy i elektrotransferu firmy BioRad (Hercules, Stany Zjednoczone)
- automatyczny licznik komórek model TC20[™] firmy BioRad (Hercules, Stany Zjednoczone)
- blok grzejno-chłodzący: model Hot Winter 3 firmy Kucharczyk (Warszawa, Polska); model Combitherm-2 CH3-150 firmy BioSan (Korneuburg, Austria)
- ciepłarka laboratoryjna model EN 400 firmy Nüve (Ankara, Turcja)
- cyfrowy analityczny cytometr przepływowy model LSR[®] II firmy Becton Dickinson (Franklin Lakes, Stany Zjednoczone)
- czytnik mikroplątek model SPECTROstar[®] Nano firmy BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Niemcy)
- czytnik plątek do pomiaru fluorescencji model Fluoroskan[™] firmy Thermo Scientific[™] (Waltham, Stany Zjednoczone)
- fluorescencyjny automatyczny licznik komórek model ADAM^{MC} firmy Digital Bio (Seul, Korea)
- inkubator CO₂ do hodowli komórek model EC 160 firmy Nüve (Ankara, Turcja)
- koagulometr model Optic K-3002 firmy Kselmed (Grudziądz, Polska)
- kołyska laboratoryjna model WAVETEC firmy INFORS HT (Bottmingen, Szwajcaria)
- komora z przepływem laminarnym model Safe 2020 firmy Thermo Scientific[™] (Waltham, Stany Zjednoczone)
- mikroskop fluorescencyjny o odwróconej optyce model Eclipse E400 firmy Nikon z kamerą ProgRes MF cool firmy Jenoptik (Tokio, Japonia)
- mikroskop konfokalny odwrócony model TCS SP8 firmy Leica (Wetzlar, Niemcy)
- mikroskop świetlny kontrastowo-fazowy o odwróconej optyce model Primo Vert firmy Carl Zeiss z kamerą AxioCam 105 color (Oberkochen, Niemcy)
- spektrofotometr model Helios α UV/Vis firmy Unicam (Cambridge, Wielka Brytania)
- wagi laboratoryjne firmy RADWAG (Radom, Polska): analityczna – model AS 60/220.R2; precyzyjna – model PS 200/2000.R2.H
- wielodetekcyjny czytnik plątek model Synergy[™] HTX firmy BioTek (Winooski, Stany Zjednoczone)
- wirówka model 3K30 firmy Sigma (Osterode am Harz, Niemcy)

- wirówka model MPW-352R firmy MPW MED. Instruments (Warszawa, Polska)
- zamrażarka laboratoryjna głębokiego mrożenia model BM EVO 515 firmy Froilabo (Mezrieu, Francja)

9. Metody

9.1. Przygotowanie supernatantów

Supernatanty z komercyjnych koncentratów krwinek czerwonych otrzymywano według metody opisanej przez Westermana i wsp. [193]. Jednostki KKCz zakupione w RCKiK w Łodzi wirowano przez 10 minut przy $2\,000 \times g$ (4°C). Następnie zbierano supernatant do czystej, sterylnej probówki typu falkon i ponownie wirowano przez 10 minut przy $3\,000 \times g$ (4°C) (Rycina 14). Otrzymany w ten sposób supernatant zawierał między innymi mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego (*ang. EMPs; erythrocyte-derived microparticles*). W celu uproszczenia i skrócenia zapisu supernatant otrzymany z jednostki KKCz nie poddanej leukoredukcji (niefiltrowanej) oznaczono jako sNLR (*ang. non-leukoreduced*), zaś supernatant pochodzący z jednostki KKCz poddanej leukoredukcji (filtrowanej) jako sLR (*ang. leukoreduced*). Supernatanty z niefiltrowanych (sNLR) i filtrowanych (sLR) KKCz przygotowywano w 1. (sNLR1, sLR1) oraz 42. dniu (sNLR42, sLR42) przechowywania w warunkach chłodniczych ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Procedurę otrzymywania supernatantów wykonywano w jałowych warunkach (komora laminarna) poprzez zastosowanie sterylnego sprzętu laboratoryjnego (tj. probówki, pipety serologiczne, strzykawki). Supernatanty z KKCz oraz ich filtry były porcjowane i przechowywane w -70°C .



Rycina 14. Procedura otrzymywania supernatantów z jednostek KKCz (opracowanie własne)

Do oznaczeń parametrów czynnościowych płytek krwi supernatanty dzielono na dwie frakcje przy pomocy zestawu filtrującego Amicon[®] Ultra-0,5 (Sigma-Aldrich; St. Louis, Stany Zjednoczone), zgodnie z załączoną instrukcją producenta. Uzyskane filtry zawierające cząsteczki o masie poniżej 10 kDa wykorzystywano do dalszych oznaczeń. Natomiast, supernatanty wykorzystywane do badań na liniach komórkowych przed zamrożeniem zostały przefiltrowane przez sterylne filtry strzykawkowe z membraną polieterosulfonową (*ang. PES*;

polyethersulfone) o wielkości porów 0,22 µm (TPP Techno Plastic Products AG; Switzerland).

9.2. Oznaczanie poziomu wybranych parametrów w supernatantach KKCz (świeżych i przechowywanych)

9.2.1. Oznaczanie stężenia pozakomórkowej (wolnej) hemoglobiny

Stężenie pozakomórkowej (wolnej) hemoglobiny (*ang. free Hb*) oznaczano metodą cyjanomethemoglobinową z odczynnikiem Drabkina [194, 195]. Hemoglobina oraz jej pochodne (z wyjątkiem sulfohemoglobiny) pod wpływem odczynnika Drabkina ulegają przekształceniu w trwałą pochodną cyjanową - cyjanomethemoglobinę. Powstającą w reakcji pochodną oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm.

Przebieg oznaczenia

Do 1,25 ml odczynnika Drabkina dodawano 10 µl supernatantu otrzymanego z KKCz. Następnie próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Mierzono absorbancję przy długości fali 540 nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH) wobec odczynnika Drabkina. Stężenie pozakomórkowej Hb [g/dl] obliczano na podstawie milimolowego współczynnika absorpcji wynoszącego 44,0 ($\lambda = 540$ nm).

$$Hb [g/dl] = \frac{A_{540\text{ nm}} \cdot \text{masa molowa Hb} \cdot \text{rozcieńczenie}}{m_{\varepsilon} \cdot 10 \cdot 1000}$$

9.2.2. Pomiar stężenia hemu

Stężenie hemu w badanych supernatantach oceniano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników QuantiChrom™ Heme Assay Kit (BioAssays Systems). Zestaw ten oparty jest na metodzie, w której hem przekształcany jest do postaci barwnej w wodnym roztworze o odczynie alkalicznym. Intensywność powstającej barwy, mierzona przy długości fali 400 nm, jest wprost proporcjonalna do stężenia hemu w badanej próbce.

Przebieg oznaczenia

Do studzienek 96-dołkowej płytki nanoszono po 50 µl badanych supernatantów, a następnie dodawano po 200 µl komercyjnego odczynnika wchodzącego w skład zestawu. Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Równolegle przygotowywano

próbę ślełą (blank) oraz kalibrator poprzez naniesienie 50 µl wody do dołków stanowiących próbę ślełą i 50 µl kalibratora - następnie dodawano po 200 µl wody do obu typów studzienek. Tak rozcieńczony kalibrator odpowiadał stężeniu hemu równym 62,5 µM. Po inkubacji, mierzono absorbancję przy długości fali 400 nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Stężenie hemu [µM] w badanych próbach oznaczano na podstawie wzoru:

$$\text{Stężenie hemu } [\mu\text{M}] = \frac{A_{400 \text{ próby badanej}} - A_{400 \text{ próby ślepej}}}{A_{400 \text{ kalibratora}} - A_{400 \text{ próby ślepej}}} \cdot 62,5$$

9.2.3. Pomiar stężenia żelaza (Fe²⁺, Fe³⁺)

Stężenie żelaza (Fe²⁺, Fe³⁺) w badanych supernatantach oceniano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników QuantiChrom™ Iron Assay Kit (BioAssays Systems). Metoda ta wykorzystuje chromogen, który tworzy specyficzny niebieski barwny kompleks z Fe²⁺. Jony Fe³⁺ w próbce są redukowane do Fe²⁺, co umożliwia oznaczenie całkowitego stężenia żelaza w badanym materiale. Intensywność powstającej barwy, mierzona przy długości fali 590 nm, jest wprost proporcjonalna do stężenia żelaza w badanej próbce.

Przebieg oznaczenia

Do studzienek 96-dołkowej płytki nanoszono po 50 µl rozcieńczonych wzorców i 50 µl prób badanych. Krzywą wzorcową dla żelaza wykonywano w zakresie stężeń od 25 do 1000 µg/dl. Przygotowywano odpowiednią ilość odczynnika roboczego poprzez zmieszanie 20 objętości odczynnika A z 1 objętością odczynnika B i 1 objętością odczynnika C. Do dołków zawierających wzorce i próby badane dodawano 200 µl odczynnika roboczego. Do dołków zawierających próbę ślełą (50 µl próby badanej) dodawano 200 µl odczynnika A. Płytki inkubowano przez 40 minut w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 590 nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Stężenie żelaza [µg/dl] w badanych próbach obliczano na podstawie uzyskanej krzywej wzorcowej – zgodnie z poniższym równaniem:

$$\text{Stężenie żelaza } [\mu\text{g/dl}] = \frac{A_{590 \text{ próby badanej}} - A_{590 \text{ próby ślepej}}}{\text{współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej}}$$

9.2.4. Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) badanych supernatantów oceniano na podstawie metody opierającej się na redukcji kationorodnika ABTS^{•+} (roztwór o niebieskozielonym zabarwieniu) opracowanej przez Erel'a i wsp. [196, 197]. Rodnik ten powstaje w środowisku kwaśnym w wyniku reakcji zredukowanego ABTS z nadtlakiem wodoru. Antyoksydanty obecne w badanym materiale biologicznym redukują kationorodnik ABTS^{•+} powodując odbarwienie roztworu w stopniu wprost proporcjonalnym do ich zawartości. Miara ilości antyoksydantów w próbce jest spadek wartości absorbancji.

Przebieg oznaczenia

Do 200 µl 0,4 M buforu octanowego (pH 5,8) dodawano po 5 µl badanych supernatantów. Mierzono absorbancję w czytniku płytek przy $\lambda = 415$ nm (A_0) (SPECTROstar[®] Nano, BMG LABTECH GmbH). Następnie dodawano do każdej studzienki na płycie 96-dołkowej po 20 µl 10 mM roztworu kationorodnika ABTS^{•+} w 30 mM buforze octanowym (pH 3,6). Równolegle przygotowywano próbę kontrolną (blank; spontaniczna redukcja kationorodnika) zawierającą 205 µl 0,4 M buforu octanowego (pH 5,8) z 20 µl roztworu kationorodnika ABTS^{•+}. Inkubowano płytkę przez 5 minut w temperaturze pokojowej, następnie mierzono absorbancję przy 415 nm (A_1). Sporządzano krzywą wzorcową dla Troloxu (0,008 – 1,0 µmol/ml). Absorbancję mierzono przy 415 nm, następnie dodawano po 20 µl roztworu kationorodnika ABTS^{•+}. Próbki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i ponownie mierzono absorbancję przy długości fali 415 nm. CPA supernatantów, wyrażony w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu, obliczono na podstawie różnic absorbancji $A_1 - A_0$ (po uprzednim odjęciu: $A_{1 \text{ BLANK}} - A_{0 \text{ BLANK}}$), krzywej wzorcowej oraz poprzez pomnożenie uzyskanego wyniku 2 razy (1 cząsteczka Troloxu reaguje z 2 wolnymi rodnikami).

9.2.5. Oznaczanie populacji mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego metodą cytometrii przepływowej

Mikrocząstki to fosfolipidowe pęcherzyki wielkości 0,2 – 2,0 µm uwalniane z błon różnego typu komórek, w tym przez krwinki czerwone [198]. Markerem do wykrywania EMPs jest glikoforyna A (antygen powierzchniowy: CD235a). Populację mikrocząstek o wielkości poniżej 2 µm analizowano, na podstawie pomiaru rozpraszania światła (parametry: FSC

(ang. *forward scatter*; przednie rozproszenie światła; rozmiar) i SSC (ang. *side scatter*; rozproszenie światła bocznego; ziarnistość) oraz dodatniego barwienia przeciwciałami anti-CD235a/PE, za pomocą cytometru przepływowego, który skalibrowano używając kulek referencyjnych.

Przebieg oznaczenia

Mikrocząstki erytrocytarne oraz krwinki czerwone obecne w supernatantach (100 µl) znakowano mysimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiej glikoforynie A sprzężonej z fluorochromem fikoerytryną (5 µl PE Mouse Anti-Human CD235a; BD Pharmingen; Franklin Lakes, Stany Zjednoczone) [199]. Równolegle przygotowywano kontrolę niebarwioną oraz izotypową (5 µl PE Mouse IgG2b κ Isotype Control; BD Pharmingen; Franklin Lakes, Stany Zjednoczone). Tak przygotowane próbki inkubowano w ciemności przez 30 minut (4°C). Po tym czasie do każdej próbki dodawano 400 µl sterylnej soli fizjologicznej. Parametry FSC i SSC (w skali logarytmicznej), znakowanie przeciwciałami anti-CD235a/PE oraz zastosowanie polistyrenowych kulek kalibracyjnych o średnicy 2,0 µm (Flow Cytometry Size Calibration ~2,0 µm diameter nonfluorescent microspheres, Molecular Probes, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Stany Zjednoczone) pozwoliło na identyfikację mikrocząstek i krwinek czerwonych w badanych supernatantach. Analizę populacji EMPs przeprowadzono przy pomocy cytometru przepływowego BD™ LSR II (Becton Dickinson; San Diego, Stany Zjednoczone), każdorazowo zliczając 10 000 obiektów CD235a/PE-pozytywnych. Wielkość populacji EMPs wyrażano jako odsetek całkowitej liczby obiektów CD235a/PE-pozytywnych w próbie. Otrzymane dane analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo v10.4.2 (FlowJo LLC; Ashland, OR, USA).

9.2.6. Wizualizacja procesu uwalniania EMPs za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej

Do wizualizacji procesu uwalniania EMPs wykorzystano technikę charakteryzującą się wysoką rozdzielczością oraz umożliwiającą obrazowanie barwionych obiektów, tj. fluorescencyjna mikroskopia konfokalna. Zastosowany fluorescencyjny lipofilowy barwnik karbocyjaninowy wykazuje słabą fluorescencję w fazie wodnej, natomiast staje się wysoce fluorescencyjny w dwuwarstwach lipidowych, co czyni go przydatnym do znakowania błon komórkowych.

Przebieg oznaczenia

Krwinki czerwone z UKKCz/SAGM w dniu oznaczenia rozcieńczano sterylnym płynem SAGM do gęstości zawiesiny $1,0 \times 10^6$ komórek/ml. Tak przygotowane komórki znakowano przez 30 minut (37°C) fluorescencyjnym barwnikiem karbocyjaninowym (Neuro-DiO, Biotium, Inc.; Fremont, Stany Zjednoczone) w końcowym stężeniu $10 \mu\text{M}$. Procedurę wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Po inkubacji komórki wirowano przy $350 \times g$ przez 5 minut w celu odpłukania nadmiaru barwnika. Etap płukania powtarzano dodatkowo dwa razy. Wybarwione komórki zawieszono w płynie SAGM nanoszono na szkiełka podstawowe, a nałożone szkiełka nakrywkowe uszczelniano dedykowanym do tego celu uszczelniaczem CoverGrip™ Coverslip Sealant (Biotium, Inc.; Fremont, Stany Zjednoczone). Za pomocą mikroskopu konfokalnego odwróconego TCS SP-8 firmy Leica (Wetzlar, Niemcy) analizowano fluorescencję wybarwionych błon komórek przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 484 \text{ nm}$ i emisji $\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$. Wyniki przeprowadzonych obserwacji przedstawiono na fotografiach.

Badania przeprowadzono w Pracowni Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych (*Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques*) Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

9.2.7. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w układzie SDS-PAGE

Rozdział elektroforetyczny białek obecnych w supernatantach otrzymanych z KKCz przeprowadzono w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu (*ang. SDS; sodium dodecyl sulfate*) (metoda SDS-PAGE; *ang. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). Zastosowany detergent anionowy denaturuje białka obecne w próbce i nadaje im ujemny ładunek. Białka migrują w kierunku anody (elektrody dodatniej) z prędkością odwrotnie proporcjonalną do ich masy. Zakłada się, iż jeden anion dodecylosiarczanowy wiąże się z dwiema resztami aminokwasowymi [200].

Przebieg oznaczenia

Badane supernatanty poddawano precypitacji roztworem zimnego acetonu. Wytrącony osad białek rozpuszczano w buforze TBS o pH 7,4. Następnie oznaczano stężenie białka przy pomocy odczynnika Bradford. Do preparatów białkowych dodawano równą objętość

buforu lizującego (0,0625 M Tris/HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -merkaptoetanol, pH 6,8). Tak przygotowane próbki ogrzewano w bloku grzejnym w temperaturze 95°C przez 5 minut.

Komercyjne gradientowe żele poliakrylamidowe Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gels 4-20% (Bio-Rad; Hercules, Stany Zjednoczone) umieszczano w aparacie do elektroforezy (Mini-PROTEAN[®] Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad) i zalewano buforem elektrodowym (0,025 M Tris/HCl, 0,1% SDS, 0,192 M glicyna, pH 8,3), a następnie usuwano grzebienie. Do studzienek nanoszono po 10 μ g mieszaniny białek lub 3-6 μ g w przypadku rozdzielców, które następnie wykorzystywane były do elektrotransferu. Do studzienek nanoszono mieszaninę białek wzorcowych Precision Plus Protein[™] Standards (Bio-Rad; Hercules, Stany Zjednoczone), co zapewniało możliwość wyznaczenia mas cząsteczkowych badanych białek. Elektroforezę prowadzono zgodnie z instrukcją producenta żeli, tzn. pod napięciem 200 V przez 30-40 minut. Po zakończonym rozdziale żele barwiono przez 30 minut w roztworze barwnika (0,125% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% kwas octowy). Nadmiar barwnika usuwano poprzez płukanie w roztworze odbarwiacza (25% metanol, 10% kwas octowy).

9.2.8. Detekcja grup karbonylowych techniką Western blot

Grupy karbonylowe białek związanych z membraną inkubowano z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH) w celu przeprowadzenia ich w pochodne DNPH. Powstały w wyniku addycji 2,4-dinitrofenylohydrazon (DNP-białko) wykrywany był za pomocą przeciwciał anty-DNP (I-rzędowych) oraz II-rzędowych przeciwciał skompleksowanych z peroksydazą chrzanową (HRP). Chemiluminescencję rejestrowano na kliszy rentgenowskiej [201].

Przebieg oznaczenia

Pierwszym etapem metody był elektroforetyczny rozdział białek obecnych w supernatantach otrzymanych z KKCz w żelu poliakrylamidowym w układzie SDS-PAGE, z pominięciem etapu barwienia i odbarwiania żelu. Membranę (immobilon P) aktywowano w 100% metanolu, a następnie złożono „kanapkę” i przeprowadzano elektrotransfer (Mini Trans-Blot[®] Module, Bio-Rad) przez noc w temperaturze 4°C pod napięciem 30 V. Po zakończonym transferze membranę płukano buforem PBS i inkubowano w 0,0024% roztworze DNPH (pH 6,2) w ciemności przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji immobilon P płukano mieszaniną PBS:etanol (1:1) oraz PBS, a następnie blokowano

przez 2 godziny w temperaturze pokojowej roztworem blokującym (5% mleko odtłuszczone w PBST). W kolejnym etapie membranę inkubowano przez 60 minut z I-rzędowymi przeciwciałami króliczymi anty-DNP w roztworze blokującym (1:1 000), a następnie z II-rzędowymi przeciwciałami anty-króliczymi skompleksowanymi z HRP w roztworze blokującym (1:10 000) po uprzednim odpłukaniu membrany w PBST. Immobilon P inkubowano przez 3 minuty w roztworze do wywołania luminogramu (2,8 mM roztwór luminolu w 0,1 M Tris/HCl o pH 8,6 z dodatkiem 200 μ l 6,7 mM kwasu p-hydroksykumarowego w DMSO oraz 20 μ l 30% H₂O₂), a następnie umieszczano go w kasecie fotograficznej. Chemiluminescencję rejestrowano na kliszy rentgenowskiej. Dodatkowo membranę nietrwale wybarwiano w 0,1% roztworze czerwieni Ponceau S w 5% kwasie octowym w celu potwierdzenia wydajności transferu białek z żelu na membranę.

9.3. Ocena parametrów czynnościowych płytek krwi po uprzedniej inkubacji z supernatantami pochodzącymi z KKCz

9.3.1. Inkubacja z supernatantami

Materiał biologiczny (osocze bogatopłytkowe, zawiesinę płytek krwi w buforze Tyroda, krew pełną, osocze) inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C z badanymi supernatantami i ich filtratami zawsze z zachowaniem zgodności grup krwi układu AB0 RhD. Supernatanty inkubowano z materiałem biologicznym w stosunku 1:9 (10%), co odpowiada przetoczeniu około 2 jednostek KKCz (~500 ml) *in vivo*, biorąc pod uwagę, że w organizmie dorosłego człowieka o przeciętnej masie ciała jest około 5 litrów krwi.

9.3.2. Badanie adhezji płytek krwi do fibrynogenu i kolagenu typu I

Adhezję płytek krwi do fibrynogenu i kolagenu typu I badano statyczną metodą spektrofotometryczną [202]. Oznaczenie liczby płytek krwi przylegających do badanego białka adhezyjnego pozwala ocenić zdolności adhezyjne tych komórek. W ostatnim etapie, płytki krwi związane na płycie mikrotitracyjnej poprzez białko adhezyjne ulegają lizie w wyniku działania odczynnika BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific). Ilość powstającego barwnego kompleksu, oznaczanego spektrofotometrycznie przy długości fali 562 nm, jest wprost proporcjonalna do stężenia białka płytek krwi, które uległy adhezji.

Przebieg oznaczenia

Studzienki mikropłytek opłaszczano 100 µl roztworu białka adhezyjnego (0,1 mg/ml fibrynogenu w TBS pH 7,5 lub 0,02 mg/ml kolagenu typu I w 0,05% kwasie octowym) przez noc w temperaturze 4°C. Po 3-krotnym przepłukaniu buforem TBS (20 mM Tris/HCl; 0,9% NaCl; pH 7,5), w celu usunięcia niezaadsorbowanego białka adhezyjnego, 96-dołkowe płytki blokowano 200 µl 1% (m/v) roztworu albuminy surowicy bydlęcej (*ang. BSA; bovine serum albumin*) w TBS (pH 7,5) przez 2 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji roztwór BSA usunięto poprzez przepłukanie 3-krotnie buforem do płukania (20 mM Tris/HCl; 0,9% NaCl; 0,04% Tween 20; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂ × 2 H₂O; pH 7,5). Zawiesinę płytek krwi w buforze Tyroda (127 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,5 mM NaH₂PO₄; 12 mM NaHCO₃; 5 mM HEPES; 5,6 mM glukoza; pH 7,4) inkubowano z odpowiednimi supernatantami i ich filtratami. Następnie, zawiesinę płytek krwi (o mianie 2,0 × 10⁸ płytek/ml [203]) nanoszono na płytki 96-dołkowe (po 100 µl) i dodawano 50 µl roztworu trombiny (w końcowym stężeniu 0,1 U/ml) na połowę płytki. Po 90 minutach inkubacji w temperaturze 37°C płytki przemywano buforem do płukania. Następnie nanoszono po 200 µl komercyjnego odczynnika wchodzącego w skład zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (30 minut, 37°C). Absorbancję mierzono przy długości fali 562 nm w czytniku mikropłytek (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Otrzymane wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto poziom adhezji komórek kontrolnych (nietraktowanych).

9.3.3. Pomiar agregacji płytek krwi

Agregację płytek krwi indukowaną fizjologicznym agonistą – kolagenem oznaczano metodą turbidymetryczną [204] w osoczu bogatopłytkowym (*ang. PRP; platelet-rich-plasma*), w optycznym agregometrze Chrono-Log® 490 (Chrono-Log Corporation; Havertown, Stany Zjednoczone). Zasada pomiaru polega na monitorowaniu zmian w przepuszczalności światła przechodzącego przez badane PRP. Podczas zlepiania się płytek krwi przepuszczalność światła zwiększa się. Otrzymane wyniki przedstawiają odsetek agregacji [%], zakładając, że próba odnośnikowa (osocze ubogopłytkowe; *ang. PPP; platelet-poor-plasma*) wykazuje 100% przepuszczalności światła przechodzącego.

Przebieg oznaczenia

Krew pełną wirowano przy 235 × g przez 12 min. w 25°C w celu otrzymania PRP. Krew pozbawioną PRP ponownie wirowano przy 2 000 × g, 15 min., 25°C w celu otrzymania

PPP – próba odnośnikowa. Następnie 450 μ l PRP inkubowano z 50 μ l badanych supernatantów i ich filtratów. Agregometr nagrzewano do temperatury 37°C, wstawiano kuwety z dipolem magnetycznym i nanoszono po 499 μ l uprzednio inkubowanego PRP. Następnie zerowano aparat oraz dodawano 1 μ l kolagenu (końcowe stężenie agonisty 2 μ g/ml). Przebieg procesu agregacji płytek krwi w agregometrze optycznym Chrono-Log[®] 490 rejestrowano przez 10 minut. Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto stopień agregacji komórek kontrolnych (nieotraktowanych).

9.3.4. Oznaczanie biologicznej aktywności płytek krwi

Poziom aktywacji i reaktywności płytek w krwi pełnej oceniano za pomocą cytometrii przepływowej [205]. Zastosowano antygen CD61, receptor błonowy obecny na powierzchni płytek krwi, który pozwala odróżnić różne subpopulacje płytek (mikrocząstki płytek krwi, płytki krwi, agregaty płytek krwi) od innych komórek obecnych w badanych próbkach. Mikrocząstki oraz agregaty płytkowe określano na podstawie dwóch parametrów: dodatniego barwienia za pomocą przeciwciał anti-CD61/PerCP i parametrów FSC i SSC. Kulki referencyjne wykorzystano do ustalenia bramek dla mikrocząstek i agregatów płytkowych. Mikrocząstki płytkowe i agregaty płytek krwi scharakteryzowano jako obiekty CD61/PerCP-pozytywne z parametrem FSC poniżej $10^{2,2}$ (mikrocząstki) i powyżej $10^{4,4}$ (agregaty).

Do oceny stopnia aktywacji i reaktywności płytek krwi *in vitro* wykorzystano dwa powszechnie stosowane markery aktywacji płytek: CD62P (ekspresja powierzchniowej selektyny-P płytek) i PAC-1 (wiązanie do aktywnej formy receptora glikoproteiny IIb/IIIa). Płytki z ekspresją powierzchniowej selektyny P określono jako obiekty z fluorescencją PE powyżej $10^{3,1}$. Natomiast obiekty z fluorescencją FITC powyżej $10^{2,1}$ scharakteryzowano jako płytki z wiązaniem przeciwciała PAC-1. Wartość obiektów CD62P/PE-dodatnich, jak również obiektów PAC-1/FITC-pozytywnych wyrażano jako procent całkowitej liczby płytek krwi (każdorazowo zliczano 10 000 komórek CD61/PerCP-pozytywnych). W celu wiarygodnego odróżnienia komórek dodatnich i ujemnych pod względem antygeny przygotowywano odpowiednie próbki kontrolne (kontrolne izotypowe) w celu oceny niespecyficznego wiązania przeciwciał („niespecyficzna fluorescencja tła”).

Przebieg oznaczenia

Próbki świeżej krwi pełnej inkubowano z badanymi supernatantami lub bez ich dodatku

(kontrola) przez 15 minut w temperaturze 37°C. Po inkubacji część próbek aktywowano kolagenem (20 µg/ml) lub ADP (20 µM) przez kolejne 10 minut w temperaturze 37°C. Wszystkie próbki utrwalano przez 60 minut (37°C) w 1% roztworze CellFIX. Następnie barwiono próbki (30 minut w ciemności, temperatura pokojowa) specyficznymi przeciwciałami (anty-CD61/PerCP; PAC-1/FITC; anty-CD62P/PE). Równolegle przygotowano odpowiednie próbki do kompensacji (niebarwiona próbka; nieaktywowana utrwalona próbka krwi barwiona anty-CD61/PerCP lub anty-CD61/FITC lub anty-CD61/PE). Bezpośrednio przed analizą cytometryczną do próbek dodawano sterylny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl). Analizę funkcji płytek krwi w świeżych próbkach pełnej krwi przeprowadzono przy pomocy cytometru przepływowego BD™ LSR II (Becton Dickinson; San Diego, USA). Każdorazowo mierzono fluorescencję 10 000 obiektów CD61/PerCP-pozytywnych. Otrzymane dane analizowano w oprogramowaniu FlowJo v10.4.2 (FlowJo LLC; Ashland, OR, USA).

9.3.5. Oznaczenia koagulometryczne

9.3.5.1. Pomiar czasu trombinowego osocza (TT)

Czas trombinowy osocza (*ang. TT; thrombin time*) jest wskaźnikiem pozwalającym ocenić sprawność przekształcania rozpuszczalnego fibrynogenu do nierozpuszczalnej fibryny (włóknika) pod wpływem czynnika krzepnięcia IIa (trombiny).

Przebieg oznaczenia

Do próbki (kuwety) umieszczonej w bloku grzejnym (37°C) dodawano po 50 µl osocza (uprzednio inkubowanego z badanymi supernatantami). Po upływie 1 minuty nanoszono 100 µl roztworu trombiny o stężeniu 4,5 U/ml (końcowe stężenie 3 U/ml). Rejestrowano czas [s] pojawienia się skrzepu fibrynowego. Pomiar został przeprowadzony za pomocą koagulometru Kselmed Optic K-3002.

9.3.5.2. Pomiar czasu protrombinowego osocza (PT)

Czas protrombinowy osocza (*ang. PT; prothrombin time*) pozwala ocenić sprawność procesu zewnątrzpochodnej aktywacji protrombiny. Wynik pomiaru zależy od ilości następujących czynników w osoczu: II, V, VII, X i fibrynogenu. Pomiar czasu pojawienia się skrzepu rozpoczyna się po dodaniu ekstraktu z mózgow króliczych zawierającego

tromboplastynę (czynnik krzepnięcia III; czynnik tkankowy), lipidy oraz jony wapnia.

Przebieg oznaczenia

Do próbówki umieszczonej w bloku grzejmym (37°C) wprowadzano po 50 µl osocza (uprzednio inkubowanego z badanymi supernatantami) i inkubowano przez 2 minuty. Następnie dodawano 100 µl tromboplastyny w 0,025 M roztworze CaCl₂ (odczynnik Dia-PT). Rejestrowano czas [s] pojawienia się skrzepu fibrynowego. Pomiar został przeprowadzony za pomocą koagulometru Kselmed Optic K-3002.

9.3.5.3. Pomiar czasu kaolinowo-kefalinowego osocza (APTT)

Czas kaolinowo-kefalinowy osocza (*ang. APTT; activated partial thromboplastin time*) jest wskaźnikiem sprawności funkcjonowania wewnątrzpochodnego mechanizmu aktywacji protrombiny. Pomiar APTT pozwala na określenie niedoborów następujących czynników krzepnięcia: I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII. Podczas oznaczenia czynnik krzepnięcia XII, następnie XI ulega aktywacji. Po dodaniu CaCl₂ aktywują się kolejne czynniki, co w następstwie prowadzi do wytworzenia skrzepu.

Przebieg oznaczenia

Do próbówki umieszczonej w bloku grzejmym (37°C) wprowadzano po 50 µl osocza (uprzednio inkubowanego z badanymi supernatantami) oraz 50 µl odczynnika Dia-PTT (buforowany kefalinowy wyciąg z mózgow króliczych). Mieszaninę inkubowano przez 3 minuty, po czym dodawano 50 µl 0,025 M roztworu CaCl₂. Rejestrowano czas [s] pojawienia się skrzepu fibrynowego. Pomiar został przeprowadzony za pomocą koagulometru Kselmed Optic K-3002.

9.4. Ocena działania supernatantów KKCz na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych

9.4.1. Hodowla komórkowa

Komórki hodowano w inkubatorze CO₂ (37°C, 5% CO₂, 90-95% wilgotności względnej, 95% powietrza) w odpowiednim dla danej linii medium wzrostowym, wzbogaconym 10% (v/v) FBS (inaktywowaną termicznie bydlęcą surowicą płodową;

ang. fetal bovine serum) i 1% (v/v) roztworem antybiotyków (10 000 U/ml penicyliny i 10 mg/ml streptomycyny). Wyjątek stanowiły komórki linii MCF-10A, które hodowano w medium wzrostowym MEBMTM uzupełnionym suplementami i czynnikami wzrostu MEGMTM SingleQuotsTM (Lonza; Basel, Szwajcaria), tj. hydrokortyzon, ludzka rekombinowana insulina, gentamycyna, ekstrakt przysadki mózgowej bydlęcej (ang. BPE; bovine pituitary extract), rekombinowany ludzki naskórkowy czynnik wzrostu (ang. rhEGF; recombinant human epidermal growth factor). Komórki linii K-562 i A2780 hodowano w pożywce hodowlanej RPMI-1640 (ang. Roswell Park Memorial Institute 1640), LoVo i MCF7 w DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) (w przypadku linii MCF7 podłoże podstawowe wzbogacono ludzką rekombinowaną insuliną w końcowym stężeniu 0,01 mg/ml). Kompletną pożywką wzrostową dla linii komórkowej PC-3 stosowaną w badaniach był DMEM:F12 (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F12).

Tabela 8. Warunki hodowli komórek w poszczególnych oznaczeniach

Linia	Medium hodowlane	cisPt [½ IC ₅₀]	CCK-8 [komórek/dolek]	BrdU [komórek/dolek]	RFT [komórek/dolek]	Kaspaza-3/7 [komórek/dolek]	Kaspaza-9 [komórek/dolek]
K-562	RPMI-1640	10 µM	5 000	5 000	5 000	20 000	40 000
A2780	RPMI-1640	5 µM	20 000	-	-	-	-
LoVo	DMEM	25 µM	15 000	15 000	15 000	-	-
MCF7	DMEM + insulina (0,01 mg/ml)	25 µM	10 000	10 000	10 000	-	-
PC-3	DMEM:F12	10 µM	15 000	-	-	-	-
MCF-10A	MEBM TM + MEGM TM SingleQuots TM	40 µM	10 000	10 000	10 000	-	-

Komórki pasażowano po osiągnięciu przez hodowlę 80% konfluencji, co pozwalało utrzymywać komórki w fazie logarytmicznego wzrostu. W celu przepasażowania komórek zawieszinowej linii K-562, wirowano komórki w temperaturze pokojowej przez 3 minuty przy 125 × g. Następnie otrzymany osad zawieszano w świeżej pożywce hodowlanej i określano ilość żywych komórek (używając 0,4% błękit trypanu (Sigma-Aldrich)) przy pomocy automatycznego licznika komórek TC20TM firmy BioRad lub w hemocytometrze Thoma (1:1; zawiesina komórek:błękit trypanu). Wyszewano komórki w odpowiedniej ilości do nowych naczyń hodowlanych. Komórki linii adherentnych (A2780, LoVo, MCF7, PC-3, MCF-10A) po usunięciu medium i przepłukaniu roztworem DPBS (ang. Dulbecco's phosphate-buffered saline) odklejano od podłoża naczynia hodowlanego przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid). Proces trypsynizacji prowadzono

w inkubatorze CO₂ przez około 2-3 minuty obserwując stopień odklejenia komórek pod mikroskopem kontrastowo-fazowym o odwróconej optyce Primo Vert (Carl Zeiss) z kamerą AxioCam 105 color. Następnie inaktywowano trypsynę poprzez dodanie kompletnej pożywki hodowlanej i określano ilość żywych komórek. Otrzymaną zawiesinę dodawano do nowych naczyń hodowlanych.

Do każdego eksperymentu komórki wysiewano w odpowiedniej ilości na sterylne 96-dołkowe płytki (przezroczyste, czarne lub białe) przeznaczone do hodowli komórkowej (Tabela 8). Po 24-godzinnej inkubacji w inkubatorze CO₂ wymieniano medium na świeże i dodawano 5% objętości supernatantów KKCz (sNLR1, sNLR42, sLR1 i sLR42) lub płyn wzbogacający SAGM (główny składnik supernatantu - „rozpuszczalnik”), w obecności lub braku cisplatyny (*ang. cisPt; cisplatin*) w studziencie. Optymalną objętość supernatantu (5%) ustalono na podstawie oceny przeżywalności komórek K-562 w obecności 20, 10, 5 i 2% supernatantów. IC₅₀ dla cisplatyny wyznaczano doświadczalnie dla każdej linii komórkowej, następnie dwa razy niższe stężenia cisPt ($\frac{1}{2}$ IC₅₀) ostatecznie stosowano w eksperymentach zgodnie z Tabelą 8. W każdym doświadczeniu przygotowywano kontrolę negatywną, którą stanowiły komórki w podłożu hodowlanym (komórki nietraktowane).

9.4.2. Oznaczanie żywotności komórek

Do oceny wpływu supernatantów na żywotność komórek, w obecności i bez cisPt, przeprowadzano eksperyment zgodnie z protokołem producenta wykorzystując komercyjny odczynnik CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich; St. Louis, Stany Zjednoczone). Zasada metody opiera się na konwersji rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (sól sodowa (2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazolu; WST-8), do rozpuszczalnego w pożywce, barwnego produktu (formazanu) przez aktywne metabolicznie, żywe komórki (redukcja WST-8 przez dehydrogenazy komórkowe, w obecności nośnika elektronowego - 1-metoksy-PMS). Liczba żywych komórek w próbie jest wprost proporcjonalna do powstałej w reakcji ilości formazanu. Barwny produkt oznaczany jest spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm.

Przebieg oznaczenia

Badane komórki wysiewano na sterylne 96-dołkowe płytki hodowlane w liczbie odpowiedniej dla danej linii zgodnie z Tabelą 8. Po wysianiu komórek zawiesinowych linii K-562 dodawano badane supernatanty (5%) i do połowy ilości dołków dodawano cisPt.

Komórki linii adherentnych poddawano 24-godzinnej hodowli w inkubatorze (37°C, 5% CO₂, 90-95% wilgotność) w celu adhezji komórek do dna studzienki, następnie wymieniano pożywkę hodowlaną na świeżą i dodawano supernatanty (5%) oraz cisPt lub pożywkę (aby w każdym dołku była taka sama objętość płynu). Równolegle przygotowywano próby kontrolne. Po 24 godzinach komórki przemywano dwukrotnie roztworem DPBS, następnie do każdej studzienki dodawano 100 µl świeżej pożywki i 10 µl roztworu CCK-8. Płytkę inkubowano w inkubatorze CO₂ przez 3 godziny (komórki adherentne) lub 4 godziny (komórki zawieszinowe). Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm w czytniku płytek (SPECTROstar[®] Nano BMG LABTECH GmbH). Żywotność komórek wyrażono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto absorbancję uzyskaną w komórkach kontrolnych (nietraktowanych).

9.4.3. Oznaczanie proliferacji komórek

Proliferację komórek określano metodą immunoenzymatyczną przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Cell Proliferation ELISA - BrdU colorimetric Kit (Sigma-Aldrich; St. Louis, Stany Zjednoczone). Metoda ta polega na ocenie ilości BrdU (5-bromo-2'-deoksyurydyny; analogu pirymidyny) włączonego w miejsce tymidyny do DNA proliferujących komórek. Detekcja wbudowanego BrdU przebiega przy pomocy specyficznych przeciwciał skompleksowanych z enzymem, który następnie reaguje z odpowiednim dla niego substratem, a produkt końcowy oznaczany jest spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorbancji przy odpowiedniej długości fali.

Przebieg oznaczenia

Komórki przygotowywano do oznaczenia w taki sam sposób jak do testu oceny żywotności przy pomocy odczynnika CCK-8 (Tabela 8). Po 24-godzinnej hodowli komórek linii K-562, LoVo, MCF7 oraz MCF-10A w obecności 5% supernatantów KKCz komórki znakowano BrdU (w końcowym stężeniu 10 µM) przez 2 godziny w inkubatorze CO₂. Na tym etapie do DNA proliferujących komórek włącza się BrdU zamiast tymidyny. Po wyznakowaniu komórki utrwalono, a DNA zdenaturowano poprzez inkubację z roztworem FixDenat przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem procedury była 90-minutowa inkubacja (w temperaturze pokojowej) komórek z przeciwciałami anty-BrdU skompleksowanymi z peroksydazą chrzanową (HRP), które łączą się z BrdU włączonym do nowo syntetyzowanego komórkowego DNA. Następnie komórki przemywano 3-krotnie

buforem do płukania (roztwór PBS) i dodawano po 100 μ l roztworu substratu dla HRP (30 min, temperatura pokojowa). Każdorazowo przygotowywano odpowiednią próbę ślepą (niespecyficzne wiązanie BrdU i przeciwciał anti-BrdU-HRP do mikropłytki) oraz kontrolę niespecyficznej fluorescencji tła (niespecyficzne wiązanie przeciwciał anti-BrdU-HRP z komórkami w nieobecności BrdU). Absorbancję mierzono przy długości fali 370 nm i 492 nm (pomiar referencyjny) w czytniku mikropłytek (SPECTROstar[®] Nano, BMG LABTECH GmbH). Proliferację komórek przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto absorbancję uzyskaną w komórkach kontrolnych (nietraktowanych).

9.4.4. Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu RFT

Wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu (RFT, *ang.* ROS; *Reactive Oxygen Species*) w komórkach badanych linii określano używając sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA (dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny) [206]. Zasada metody opiera się na utlenieniu sondy H₂DCF-DA (zredukowana chemicznie postać fluoresceiny) przez wewnątrzkomórkowe RFT. Sonda przenika do wnętrza komórki, gdzie ulega hydrolizie do H₂DCF (postać niefluoryzująca), następnie zostaje utleniona przez RFT. Powstająca w reakcji 2',7'-dichlorofluoresceina (*ang.* DCF; *2',7'-dichlorofluorescein*) wykazuje maksymalną fluorescencję przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 495$ nm i emisji $\lambda_{\text{em}} = 529$ nm. Ilość reagujących z sondą RFT w komórce jest wprost proporcjonalna do intensywności fluorescencji sondy.

Przebieg oznaczenia

Komórki adherentne (LoVo, MCF7 oraz MCF-10A) wysiewano na czarne, sterylne 96-dołkowe płytki z przezroczystym dnem w ilości odpowiedniej dla danej linii komórkowej (Tabela 8). Po 24-godzinnej hodowli komórki inkubowano (30 min, 37°C, 5% CO₂, bez dostępu światła) z 10 μ M sondą H₂DCF-DA w jałowym buforze HBSS (*ang.* *Hanks' Balanced Salt Solution*: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES, 1% glukozy, pH 7,0). Komórki zawiesinowe linii K-562 były traktowane w nieco odmienny sposób. Komórki K-562 wirowano (1 500 \times g, 5 min), a następnie osad komórek zawieszano w buforze HBSS z 10 μ M sondą H₂DCF-DA (30 min, 37°C, 5% CO₂). W kolejnym etapie usuwano sondę fluorescencyjną, a komórki (adherentne i zawiesinowe) przemywano 2-krotnie buforem HBSS. Komórki zawiesinowe zawieszano w buforze do przemywania i wysiewano na 96-dołkową czarną, jałową płytkę. Do studzienek dodawano badane

supernatanty KKCz oraz cisPt ($\frac{1}{2}$ IC₅₀) lub medium - inkubowano płytki przez 60 min w 37°C. Równolegle przygotowywano kontrolę pozytywną, którą stanowiły komórki traktowane 10 μ M H₂O₂ oraz kontrolę negatywną, czyli komórki zawieszane w buforze HBSS (nieaktowane). Rejestrowano intensywność fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 485$ nm i emisji $\lambda_{em} = 538$ nm (Fluoroskan™, Thermo Scientific™). Wewnątrzkomórkowy poziom RFT w komórkach badanych linii przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto fluorescencję uzyskaną w komórkach kontrolnych (nieaktowanych).

9.4.5. Oznaczanie uszkodzeń DNA komórek

Stopień uszkodzeń DNA (pęknięcia jedno- i dwuniciowe oraz miejsca alkalicznie labilne) oceniano przy pomocy testu kometowego w wersji alkalicznej, na podstawie metody opisanego przez Singh i wsp. [207] z modyfikacjami Klaude i wsp. [208]. Metoda ta pozwala określić poziom uszkodzeń DNA, wywołanych badanymi czynnikami, na podstawie rozdzielania elektroforetycznego pojedynczej komórki w żelu agarozowym (ang. *single cell gel electrophoresis*). W pierwszym etapie eksperymentu badane komórki unieruchamiane są w agarozie na uprzednio opłaszczonym szkiełku podstawowym. Komórki poddawane są lizie, aby uwolnić z nich jądrowe DNA, które następnie zostanie rozwinięte. Podczas rozdzielania elektroforetycznego pojedynczej komórki w warunkach alkalicznych DNA migruje z prędkością zależną od stopnia jego fragmentacji. Preparaty barwi się barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) i analizuje w mikroskopie fluorescencyjnym. Otrzymany obraz mikroskopowy komórek przedstawia „komety” – obserwuje się charakterystyczną „głowę”, która stanowi miejsce unieruchomienia komórki przed lizą oraz charakterystyczny „ogon” odpowiadający pętłom i fragmentom nici DNA uwolnionym podczas lizy komórki ze struktur jądrowych w wyniku uszkodzenia DNA [209].

Przebieg oznaczenia

Do probówek typu eppendorf rozporcjowywano po 5×10^4 komórek linii K-562, LoVo, MCF7 oraz MCF-10A, następnie dodawano supernatanty KKCz (5%; linia K-562 - także 20%) i inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C. Następnie komórki wirowano (180 \times g, 15 min, 25°C), a osad zawieszano w 1% (m/v) agarozie o niskiej temperaturze topnienia (ang. *LMP; Low Melting Point*) i наносzono na uprzednio opłaszczone 0,5% (m/v) agarozą o normalnej temperaturze topnienia (ang. *NMP; Normal Melting Point*) szkiełka podstawowe. Równolegle przygotowywano kontrolę negatywną (komórki nieaktowane), kontrolę

z odpowiednim dodatkiem płynu wzbogacającego SAGM oraz pozytywną (komórki inkubowane 15 minut na lodzie w obecności 10 μM H_2O_2). Preparaty umieszczano na godzinę w 4°C w buforze lizującym (100 mM EDTA, 10 mM Tris, 2,5 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 10,0). Następnie szkiełka inkubowano przez 20 minut w 4°C w buforze rozwijającym (1 mM EDTA, 300 mM NaOH). Po inkubacji przeprowadzano rozdział elektroforetyczny przez 20 minut przy 17 V i 32 mA w buforze elektroforetycznym (1 mM EDTA, 30 mM NaOH). Po zakończonej elektroforezie szkiełka pozostawiano do wyschnięcia, a następnie komórki barwiono (60 minut, 4°C) barwnikiem fluorescencyjnym DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 40 $\mu\text{l}/\text{preparat}$) i zliczano komety pod mikroskopem fluorescencyjnym firmy Nikon model Eclipse E400, wyposażonym w kamerę ProgRes MF cool firmy Jenoptik. Z otrzymanych preparatów zliczano po 100 przypadkowo wybranych komet wykorzystując oprogramowanie Lucia-Comet (LUCIA G 5.0, moduł 4.51). Stopień uszkodzenia DNA badanych komórek przedstawiono jako zawartość DNA [%] w „ogonie”.

9.4.6. Oznaczanie aktywności kaspazy-3/7 w komórkach linii K-562

Kaspaza-3 oraz kaspaza-7 odgrywają kluczową rolę efektorową w fazie wykonawczej procesu apoptozy. Aktywność enzymatyczną kaspazy-3/7 w komórkach linii K-562 oceniano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega; Madison, Stany Zjednoczone). Specyficznym niefluorescencyjnym substratem dla kaspazy-3/7 dodawanym do komórek jest Z-DEVD-R110. Aktywna kaspaza-3 oraz kaspaza-7 powoduje rozszczepienie substratu i usunięcie sekwencji peptydów DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) generując wysoce fluorescencyjną rodaminę 110 (*ang.* R110; *rhodamine 110*) wykrywaną przy użyciu czytnika fluorescencji przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 499$ nm i emisji $\lambda_{\text{em}} = 521$ nm. Rozszczepienie substratu następuje tylko w lizatach komórek apoptotycznych, co oznacza, że ilość powstałego produktu fluorescencyjnego jest wprost proporcjonalna do ilości aktywnej kaspazy-3/7.

Przebieg oznaczenia

Komórki linii K-562 wysiewano na sterylne, czarne 96-dołkowe płytki z przezroczystym dnem, następnie nanoszono badane supernatanty (5%) oraz cisPt (w końcowym stężeniu 10 μM) lub medium (Tabela 8). Po 24-godzinnej hodowli komórek do studzienek nanoszono po 100 μl mieszaniny reakcyjnej (bufor lizujący z substratem Z-DEVD-R110). Równolegle przygotowywano szereg prób kontrolnych. Próbę ślepą (blank;

fluorescencja „tła”) stanowiło medium hodowlane bez komórek. Komórki z płynem wzbogacającym SAGM (główny składnik supernatantu - „rozpuszczalnik”) oraz komórki nietraktowane stanowiły dwie kontrole negatywne. Kontrolę pozytywną - komórki z dodatkiem cisPt (induktor apoptozy), a kontrolę dodatkową komórki inkubowane z cisPt i inhibitorem aktywności kaspaz Z-VAD-FMK (w końcowym stężeniu 20 μM). Optymalną ilość komórek w dołku, czas inkubacji z czynnikiem wywołującym apoptozę oraz długość inkubacji z mieszaniną reakcyjną ustalono doświadczalnie. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 5 godzin w temperaturze pokojowej. Pomiaru fluorescencji dokonywano przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ i emisji $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$ (Fluoroskan[™], Thermo Scientific[™]). Aktywność enzymatyczną kaspazy-3/7 w komórkach linii K-562 przedstawiono we względnych jednostkach fluorescencji RFU (*ang. Relative Fluorescence Unit*).

9.4.7. Oznaczanie aktywności kaspazy-9 w komórkach linii K-562

Kaspaza-9 odgrywa kluczową rolę w procesie inicjacji apoptozy w wewnątrzpochoicznym szlaku mitochondrialnym. Aktywność enzymatyczną kaspazy-9 w komórkach linii K-562 oceniano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Caspase-Glo[®] 9 Assay (Promega; Madison, Stany Zjednoczone). Dodanie odczynnika Caspase-Glo[®] 9 do komórek zapewnia ich lizę, a następnie rozszczepienie substratu zawierającego sekwencję LEHD przez aktywną kaspazę-9. Uwolniona w reakcji aminolucyferyna jest substratem dla lucyferazy, co skutkuje wygenerowaniem sygnału luminescencyjnego. Wygenerowany stabilny sygnał jest wprost proporcjonalny do aktywności kaspazy-9. Inhibitor proteasomów (MG-132) wchodzący w skład zestawu po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej znacząco redukuje niespecyficzne świecenie „tła” w testach opartych na komórkach hodowlanych.

Przebieg oznaczenia

Komórki linii K-562 wysiewano na sterylne, białe 96-dołkowe płytki, następnie nanoszono badane supernatanty (5%) oraz cisPt (w końcowym stężeniu 10 μM) lub medium (Tabela 8). Po 24-godzinnej hodowli komórek nanoszono do studzienek po 100 μl mieszaniny reakcyjnej (bufor lizujący z substratem i inhibitorem MG-132). Równolegle przygotowywano próby kontrolne. Próbę ślepą (blank) stanowiło medium hodowlane bez komórek. Komórki z płynem uzupełniającym SAGM (główny składnik supernatantu - „rozpuszczalnik”) oraz komórki nietraktowane stanowiły dwie kontrole negatywne. Kontrolę pozytywną -

komórki z dodatkiem cisPt (induktor apoptozy), a kontrolę dodatkową komórki inkubowane z cisPt i inhibitorem aktywności kaspaz Z-VAD-FMK (w końcowym stężeniu 20 μM). Optymalną ilość komórek w dołku, czas inkubacji z czynnikiem wywołującym apoptozę oraz długość inkubacji z mieszaniną reakcyjną ustalono doświadczalnie. Komórki delikatnie wytrząsano, inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie mierzono luminescencję z wykorzystaniem wielodetekcyjnego czytnika płytek Synergy™ HTX firmy BioTek. Aktywność enzymatyczną kaspazy-9 w komórkach linii K-562 przedstawiono we względnych jednostkach świetlnych RLU (*ang. Relative Light Unit*).

9.5. Oznaczanie wybranych markerów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu KKCz lub KKP w osoczu krwi chorych z AML

9.5.1. Oznaczanie stężenia grup tiolowych

Zawartość grup tiolowych (-SH) w badanych próbkach osocza oznaczano za pomocą metody Ellman'a [210, 211]. Zasada metody opiera się na reakcji kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) (DTNB) z wolnymi grupami tiolowymi białek i związków małowcząsteczkowych. Zawartość powstającego w reakcji anionu kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB) o intensywnym żółtym zabarwieniu oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 412 nm.

Przebieg oznaczenia

Do 20 μl badanego osocza dodawano równą objętość 10% (m/v) roztworu SDS w 10 mM buforze fosforanowym (pH 8,0). Analogicznie przygotowywano próbę odczynnikową, która zamiast osocza zawierała 10 mM bufor fosforanowy (pH 8,0), dalej postępowano tak samo jak z próbkami badanymi. Do wszystkich prób dodawano 160 μl 10 mM buforu fosforanowego (pH 8,0) i dokonywano pomiaru absorbancji przy 412 nm (A_0). Następnie dodawano 16,6 μl 0,04% (m/v) DTNB w 10 mM buforze fosforanowym (pH 8,0) (odczynnik Ellman'a). Tak przygotowaną płytkę 96-dołkową poddawano godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Po tym czasie, mierzono absorbancję przy 412 nm (A_1) (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Stężenie grup tiolowych [$\mu\text{mol/l}$] w badanych próbkach wyznaczano na podstawie molowego współczynnika absorpcji dla TNB ($\epsilon = 13\,600\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla $\lambda = 412\ \text{nm}$) i różnicy absorbancji ($A_1 - A_0$).

9.5.2. Oznaczanie stężenia białka w reakcji z kwasem bicynchoninowym (BCA)

Do pomiaru całkowitego stężenia białka w badanym osoczu używano komercyjnego zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Stany Zjednoczone). Zasada metody opiera się na dwóch reakcjach: redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ przez białko w środowisku alkalicznym oraz selektywnej i wysoce czułej reakcji wykrywania kationu miedziawego (Cu^+) przez kwas bicynchoninowy (*ang.* BCA; *bicinchoninic acid*). Powstający barwny kompleks oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 562 nm.

Przebieg oznaczenia

Przygotowywano odczynnik roboczy zgodnie z zaleceniami producenta (zmieszano w stosunku 1:50 (v/v) odczynnik nr 1: 4% roztwór $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ z odczynnikiem nr 2: roztwór zawierający 1% sól sodową BCA, 2% węglan sodu, 0,95% wodorowęglan sodu, 0,1 M NaOH, 0,16% winian dwusodowy o pH 11,2). Nanoszono po 25 μl badanego osocza (uprzednio rozcieńczonego 100 razy) do dołków płytki mikrotitracyjnej, następnie dodawano po 175 μl odczynnika roboczego. Sporządzano krzywą wzorcową dla albuminy surowicy bydlęcej (125 - 2 000 $\mu\text{g/ml}$). Płytkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 562 \text{ nm}$ (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Stężenie białka [$\mu\text{g/ml}$] w badanych próbkach obliczano na podstawie krzywej wzorcowej.

9.5.3. Oznaczanie zawartości grup karbonylowych

Poziom grup karbonylowych (-CO) w białkach osocza oznaczano metodą immunoenzymatyczną [212]. Metoda ta opiera się na reakcji grup karbonylowych białek z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH). W wyniku addycji powstaje 2,4-dinitrofenylohydrazon (DNP-białko), którego ilość można oznaczyć spektrofotometrycznie. Do oceny ilości grup karbonylowych w białkach związanych z DNPH (DNP-białko) wykorzystywane są I-rzędowe przeciwciała anty-DNP oraz II-rzędowe przeciwciała skompleksowane z peroksydazą chrzanową (HRP). Krzywą wzorcową przygotowuje się z utlenionej i zredukowanej albuminy.

Przebieg oznaczenia

Płytkę 96-dołkową o powierzchni MaxiSorp™ opłaszczano 100 μl badanego roztworu białek (10 μg białka/ml), próbek wzorców i 10 mM roztworu PBS o pH 7,4 (kontrola). Stężenie

białka w poszczególnych próbkach określano przy użyciu reakcji z kwasem bicynchoninowym (BCA) – przebieg oznaczenia opisano w podrozdziale 9.5.2. Płytki po inkubacji przez noc w 4°C przemywano roztworem PBS. Następnie наносono do studzienek po 200 µl 0,0024% (m/v) roztworu DNPH w 85% H₂SO₄ (pH 6,2) i inkubowano płytki 45 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Przemywano studzienki 5-krotnie mieszaniną PBS:etanol (1:1, v/v) oraz 2-krotnie roztworem PBS. Płytkę blokowano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej dodając po 260 µl 5% (m/v) roztworu mleka w PBS. Przemywano płytkę 3-krotnie 10 mM roztworem PBS z dodatkiem 0,1% (v/v) Tween 20 (roztwór PBST) i наносono po 200 µl I-rzędowych króliczych przeciwciał anty-DNP o mianie 1:1 000 (inkubacja 1 godzinę w temperaturze pokojowej). Ponownie przemywano płytkę roztworem PBST i dodawano do studzienek po 200 µl II-rzędowych anty-króliczych przeciwciał skompleksowanych z peroksydazą chrzanową o mianie 1:10 000 (inkubacja 1 godzinę w temperaturze pokojowej), następnie przemywano roztworem PBST. Do studzienek наносono po 200 µl roztworu substratu OPD (Sigma Fast™ OPD Tablet Sets) w celu wywołania barwy. Po inkubacji w temperaturze pokojowej (~3 min.) zatrzymywano reakcję dodając do studzienek po 100 µl 40% (v/v) kwasu siarkowego. Mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 490$ nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Równolegle poprzez zmieszanie w różnych proporcjach (0 – 100%) utlenionej albuminy bydlęcej z całkowicie zredukowaną przygotowywano krzywą wzorcową (zakres stężeń: 0,42 – 4,2 nmol grup -CO/mg białka). Stężenie grup karbonylowych w utlenionej albuminie oznaczano metodą spektrofotometryczną [213, 214]. Stężenie grup karbonylowych wyrażono w nmol/mg białek osocza.

Przygotowanie wzorców do krzywej kalibracyjnej

Redukcja albuminy wołowej (BSA)

Do roztworu BSA o stężeniu 5 mg/ml dodawano 0,01 g borowodorku sodu - pozostawiano na 30 minut. Roztwór neutralizowano dodając kroplami 2 M HCl, aż do uzyskania pH równego 7,0. Otrzymany roztwór dializowano przez noc względem 10 mM roztworu PBS (pH 7,4), a następnie mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 280$ nm ($a_{\text{albumina}} = 0,65 \text{ (g/L)}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) i obliczano stężenie białka.

Utlanie albuminy wołowej (BSA)

Roztwór BSA o stężeniu 4 mg/ml inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C z roztworem podchlorynu (HOCl; stężenie końcowe 5 mM). Spektrofotometrycznie oznaczano

zawartość grup karbonylowych w utlenionej albuminie – pomiar absorpcji przy długości fali przy $\lambda = 375$ nm względem albuminy zredukowanej (molowy współczynnik absorpcji $\varepsilon = 22\,000\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

Próbki zredukowanej oraz utlenionej albuminy wołowej (BSA) doprowadzano do stężenia 4 mg/ml, porcjowano i przechowywano w temperaturze -70°C .

9.5.4. Oznaczanie poziomu 3-nitrotyrozyny

Poziom 3-nitrotyrozyny (3-NT) w białkach badanego osocza oznaczano kompetycyjnym testem ELISA wykorzystując dwa antygeny: wolny oraz związany na płycie polistyrenowej [215]. Znitrowanym fibrynogenem o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ opłaszczają się płytki z powierzchnią MaxiSorpTM (wysokie powinowactwo do cząsteczek z podobną ilością domen hydrofilowych oraz hydrofobowych). Osocze (wolny antygen) preinkubuje się z przeciwciałami antynitrotyrozynowymi (anty-3-NT), a następnie nanosi na opłaszczoną uprzednio studzienki. Wolny antygen wychwytuje określoną ilość przeciwciał anty-3-NT, dlatego też mniej przeciwciał może ulec wiązaniu do znitrowanego fibrynogenu, którym opłaszczano płytkę. W związku z tym, w studzienkach z największą zawartością 3-NT w wolnym antygenie rejestruje się najmniejszą wartość absorpcji ($\lambda = 490$ nm), a w próbach kontrolnych największą. Krzywą wzorcową stanowiła seria rozcieńczeń znitrowanego fibrynogenu. Roztwór fibrynogenu (2 mg/ml) poddano działaniu 1 mM roztworu nadtlendioazotynu. Stężenie 3-NT w znitrowanym fibrynogenie wyznaczano spektrofotometrycznie poprzez pomiar absorpcji przy długości fali 430 nm, następnie obliczano na podstawie molowego współczynnika absorpcji $\varepsilon = 4\,400\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [216].

Przebieg oznaczenia

Studzienki mikro płytki MaxiSorpTM opłaszczano antygenem wzorcowym (roztworem znitrowanego fibrynogenu ludzkiego; 100 μl) o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ oraz inkubowano przez noc w temperaturze 4°C . Następnego dnia przemywano studzienki 0,1 M buforem Tris/HCl (pH 9,0) z dodatkiem 0,05% (v/v) Tween (bufor do płukania) i blokowano płytkę 100 μl 1% (m/v) mlekiem w buforze Tris/HCl (pH 9,0) przez 2 godziny w temperaturze 37°C . Po tym czasie ponownie przemywano studzienki buforem do płukania. W międzyczasie przygotowywano mieszaninę wolnego antygeny (badane osocze/wzorce) i przeciwciał anty-3-NT (roztwór pierwszorzędowych kozich przeciwciał anty-3-nitrotyrozynowych

o mianie 1:40 000) (1:1), którą inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po upływie czasu inkubacji наносono 100 µl mieszaniny do studzienek i inkubowano płytkę przez noc w temperaturze 4°C. Następnie przemywano studzienki buforem do płukania i наносono 100 µl roztworu biotynylowanych drugorzędowych przeciwciał (1 godzina w temperaturze pokojowej; roztwór anty-kożich biotynylowanych immunoglobulin IgG o mianie 1:2 000). Ponownie przemywano studzienki buforem do płukania i dodawano 100 µl kompleksu streptawidyny z biotynylowaną peroksydazą chrzanową (1 godzina w temperaturze pokojowej; roztwór streptawidyny skompleksowanej z biotynylowaną peroksydazą chrzanową o mianie 1:10 000). Przed naniesieniem 100 µl roztworu substratu OPD (Sigma Fast™ OPD Tablet Sets) przemywano płytkę buforem do płukania. Tak przygotowane płytki inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, blokowano reakcję poprzez dodanie 50 µl 40% (v/v) roztworu kwasu siarkowego i mierzono absorbancję przy długości fali 490 nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Równolegle przygotowywano krzywą wzorcową z roztworu znitrowanego fibrynogenu (zakres stężeń: 0,0018 – 2,0 µg/ml) stanowiącego wolny antygen. Poziom 3-nitrotyrozyny wyrażono w nmol/mg białek osocza.

9.5.5. Oznaczanie zawartości końcowych produktów zaawansowanej glikacji

Glikacją (reakcją Maillarda) nazywamy nieenzymatyczną reakcję w wyniku, której dochodzi do powstania wiązania kowalencyjnego pomiędzy grupą karbonylową lub hemiacetalową cukrów redukujących, a wolną grupą aminową białek, fosfolipidów czy kwasów nukleinowych [217]. Produkty powstałe w reakcji glikacji, nazywane końcowymi produktami zaawansowanej glikacji (*ang. AGE; Advanced Glycation End Products*), wpływają szkodliwie na funkcje białek, lipidów oraz DNA. Zawartość AGE w badanych próbkach osocza oceniano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Oxiselect™ Advanced Glycation End Product (AGE) Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs; San Diego, Stany Zjednoczone). Metoda ta polega na opłaszczeniu płytki koniugatem AGE, następnie наносzone są próbki badane o nieznannej zawartości AGE lub wzorce AGE-BSA. Po inkubacji dodawane są poliklonalne przeciwciała anty-AGE, a następnie sprzężone z HRP przeciwciała II-rzędowe. Zawartość adduktów białkowych AGE w badanych próbkach jest określana na podstawie krzywej wzorcowej AGE-BSA.

Przebieg oznaczenia

Opłaszczoną roztworem koniugatu AGE 96-dołkową płytkę inkubowano przez noc

w 4°C. Następnego dnia roztwór koniugatu AGE usuwano, a płytkę płukano dwukrotnie roztworem PBS. Do wszystkich dołków mikropłytki dodawano 200 µl buforu do rozcieńczania próbek i blokowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Następnie наносono po 50 µl badanego osocza lub wzorca AGE-BSA. Sporządzano krzywą wzorcową dla AGE-BSA w zakresie 0,39 - 100 µg/ml. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut na kołysce laboratoryjnej (WAVETEC, INFORS HT). Kolejno dodawano po 50 µl rozcieńczonych przeciwciał I-rzędowych anti-AGE i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, trzykrotnie płukano płytkę buforem do płukania oraz наносono po 100 µl rozcieńczonych przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową, z którymi inkubowano płytkę przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie płukano płytkę buforem i dodawano po 100 µl roztworu substratu obserwując pojawienie się barwy. Płytkę z substratem inkubowano na kołysce laboratoryjnej przez 8 minut w temperaturze pokojowej. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano poprzez dodanie 100 µl roztworu do blokowania reakcji. Mierzono absorbancję przy 450 nm (SPECTROstar® Nano BMG LABTECH GmbH), a stężenie AGE [µg/ml] w badanych próbkach osocza obliczano na podstawie otrzymanej krzywej wzorcowej.

9.5.6. Oznaczanie poziomu peroksydacji lipidów

Stożień peroksydacji lipidów osocza określano poprzez ilość substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (*ang. TBARS; Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) [211]. Peroksydacja lipidów to wolnorodnikowy proces utleniania przede wszystkim nienasyconych kwasów tłuszczowych, podczas którego powstają nadtlutki tych związków, a następnie aldehydy. Jednym z produktów tego procesu jest dialdehyd malonowy (*ang. MDA; malondialdehyde*), który reaguje z kwasem tiobarbiturowym (*ang. TBA; thiobarbituric acid*). Na skutek kondensacji 1 cząsteczki MDA z 2 cząsteczkami TBA powstaje barwny produkt oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali 535 nm.

Przebieg oznaczenia

Do 200 µl badanego osocza dodawano 200 µl 15% (m/v) roztworu kwasu trichlorooctowego (*ang. TCA; trichloroacetic acid*) w 0,25 M HCl. Inkubowano próbki 30 minut w łaźni lodowej. Następnie wirowano przez 15 minut przy 9 000 × g w temperaturze 20°C. Zbierano klarowny supernatant (200 µl) do czystych probówek i dodawano 200 µl 0,37% (m/v) roztworu TBA w 0,25 M HCl. Próbki inkubowano w bloku grzeijnym

przez 10 minut w temperaturze 100°C. Po wystudzeniu zbierano po 155 µl klarownej mieszaniny i наносono do studzienek na płytce mikrotitracyjnej. Mierzono absorbancję przy długości fali 535 nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Próbę odczynnikową stanowiło: 0,2 ml 0,9% NaCl, 0,2 ml odczynnika TCA i 0,2 ml odczynnika TBA. Zawartość substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) [nmol/ml] wyznaczano z molowego współczynnika absorpcji dla MDA $\epsilon = 156\ 000\ \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

9.5.7. Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) badanego osocza oceniano na podstawie metody opracowanej przez Erel'a i wsp. [196, 197]. W podrozdziale 9.2.4. szczegółowo opisano zasadę zastosowanej metody.

Przebieg oznaczenia

Do 200 µl 0,4 M buforu octanowego (pH 5,8) dodawano po 5 µl badanego osocza. Mierzono absorbancję w czytniku płytek przy 415 nm (A_0) (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Następnie dodawano do każdej studzienki na płytce 96-dołkowej po 20 µl 10 mM roztworu kationorodnika ABTS^{•+} w 30 mM buforze octanowym (pH 3,6). Równolegle przygotowywano próbę kontrolną (blank; spontaniczna redukcja kationorodnika) zawierającą 205 µl 0,4 M buforu octanowego (pH 5,8) z 20 µl roztworu kationorodnika ABTS^{•+}. Inkubowano płytkę przez 5 minut w temperaturze pokojowej, następnie mierzono absorbancję przy 415 nm (A_1). Sporządzano krzywą wzorcową dla Troloxu (zakres stężeń: 0,008 – 1,0 µmol/ml). Całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) osocza wyrażony w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu obliczano na podstawie różnic absorbancji $A_1 - A_0$ (po uprzednim odjęciu: $A_{1\ \text{BLANK}} - A_{0\ \text{BLANK}}$), krzywej wzorcowej oraz poprzez pomnożenie uzyskanego wyniku 2 razy (1 cząsteczka Troloxu reaguje z 2 wolnymi rodnikami).

9.5.8. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (*ang. SOD; superoxide dismutase*) w badanym osoczu oznaczano za pomocą komercyjnego zestawu odczynników SOD Determination Kit (Sigma-Aldrich; St. Louis, Stany Zjednoczone). SOD jest jednym z najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych - katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\bullet-}$) do nadtlenu wodoru i tlenu cząsteczkowego. Analizę aktywności SOD przeprowadza

się przy użyciu rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (sól sodowa (2-(4-jodofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-sulfofenylo)-2-tetrazolu; WST-1), która wytwarza po redukcji $O_2^{\cdot-}$ barwny formazan. Aktywność SOD hamowana jest przez oksydazę ksantynową (XO). Natomiast aktywność XO jest liniowo związana z szybkością redukcji anionorodnika ponadtlenkowego. Aktywność SOD oznaczano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 440 nm.

Tabela 9. Schemat przygotowania poszczególnych prób

	Próba badana	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Osocze	20 μ l		20 μ l	
Woda		20 μ l		20 μ l
Roztwór roboczy WST	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Roztwór roboczy enzymu	20 μ l	20 μ l		
Bufor do rozcieńczania			20 μ l	20 μ l

Przebieg oznaczenia

Do studzienek płytki 96-dołkowej z próbą badaną oraz próbą ślepą nr 2 (blank 2) nanoszono po 20 μ l badanego osocza. Do dołków zawierających próbę ślepą nr 1 (blank 1) oraz nr 3 (blank 3) nanoszono po 20 μ l wody dejonizowanej. Następnie dodawano 200 μ l roboczego roztworu WST (*WST Working Solution*) do wszystkich dołków i mieszano zawartość płytki. Do prób badanych i próby ślepej nr 1 nanoszono po 20 μ l roboczego roztworu enzymu (*Enzyme Working Solution*). Następnie nanoszono do próby ślepej nr 2 i 3 po 20 μ l buforu do rozcieńczania (*Dilution Buffer*). Schemat przygotowania poszczególnych prób opisuje Tabela 9. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 20 minut w 37°C, następnie mierzono absorbancję w czytniku przy długości fali 450 nm (SPECTROstar® Nano BMG LABTECH GmbH). Aktywność SOD (współczynnik zahamowania [%]) obliczano według wzoru:

$$\text{Aktywność SOD} = \left\{ \frac{[(A_{blank\ 1} - A_{blank\ 3}) - (A_{próba\ badana} - A_{blank\ 2})]}{(A_{blank\ 1} - A_{blank\ 3})} \right\} * 100$$

9.5.9. Oznaczanie aktywności transferazy glutationowej

Aktywność transferazy glutationowej (*ang. GST; glutathione S-transferase*) w osoczu oceniano według metody Habig i wsp. [218], opierającej się na reakcji z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (*ang. CDNB; 1-chloro-2,4-dinitrobenzene*). Transferaza glutationowa katalizuje reakcję pomiędzy zredukowanym glutationem (*ang. GSH; L-glutathione reduced*), a CDNB (substratem). Miarą aktywności GST jest szybkość powstawania barwnego koniugatu (2,4-dinitrofenylo-S-glutationu). Powstały produkt oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali 340 nm.

Przebieg oznaczenia

Do studzienek na płytce mikrotitracyjnej наносzono 170 μl 0,1 M buforu fosforanowego (pH 6,5), 10 μl 20 mM roztworu GSH i 10 μl 20 mM roztworu CDNB. Dodając po 10 μl badanego osocza zainicjowano reakcję. Przyrost absorbancji mierzono przy długości fali 340 nm (SPECTROstar[®] Nano BMG LABTECH GmbH) co minutę w ciągu 5 minut (25°C). Równolegle przeprowadzono pomiar dla próby kontrolnej, która zawierała 10 μl buforu fosforanowego zamiast osocza. Aktywność GST przedstawiono w jednostce [mU/ml] określającej ilość enzymu potrzebną do powstania 1 μmol a barwnego produktu w ciągu 1 minuty w 25°C przy pH 6,5. Wartość milimolowego współczynnika absorpcji powstającego 2,4-dinitrofenylo-S-glutationu wynosi $9,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ($\lambda = 340 \text{ nm}$).

9.5.10. Oznaczanie zewnątrzkomórkowej aktywności dehydrogenazy mleczanowej metodą Wróblewskiego i La Due

Zewnątrzkomórkową aktywność dehydrogenazy mleczanowej (*ang. LDH; lactate dehydrogenase*) w badanych próbkach osocza oznaczano metodą Wróblewskiego i La Due [219]. Wzmoczona aktywność LDH (enzymu cytozolowego) w osoczu świadczy o uszkodzeniu błony plazmatycznej. W warunkach fizjologicznych enzym ten nie jest uwalniany do środowiska. LDH katalizuje odwracalną reakcję redukcji pirogronianu do mleczanu z jednoczesnym utlenieniem NADH (*ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide; dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy*) do NAD^+ . Równowaga reakcji przy pH 7,0 przesuwana się w kierunku powstawania mleczanu, natomiast przy pH 10,0 w stronę tworzenia pirogronianu. NADH i NAD^+ wykazują pasmo absorpcyjne przy długości fali $\lambda = 260 \text{ nm}$ (zależne od obecności pierścienia pirymidynowego i purynowego). NADH (postać zredukowana) posiada dodatkowe pasmo absorpcyjne przy długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$ będące wynikiem powstania układu dihydropirydyny w cząsteczce amidu kwasu nikotynowego. Zmniejszanie się wartości absorbancji przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ w jednostce czasu jest miarą szybkości reakcji tworzenia się mleczanu i NAD^+ (postać utleniona), która w określonych warunkach jest proporcjonalna do stężenia enzymu w próbce badanej. Aktywność LDH przedstawiono w jednostce międzynarodowej [U], która określa ilość enzymu przekształcającą 1 μmol substratu/minuta/1 000 ml. Wartość milimolowego współczynnika absorpcji dla NADH wynosi $6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ przy $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Przebieg oznaczenia

Na płytkę 96-dółkową nanoszono po 270 μ l 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4) następnie dodawano 10 μ l badanego osocza oraz 10 μ l 0,25% (m/v) roztworu NADH w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,4). Inkubowano płytkę w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Kolejno dodawano po 10 μ l 0,25% (m/v) roztworu pirogronianu (substratu) w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,4) i natychmiast rozpoczynano pomiar absorbancji przy długości fali 340 nm (SPECTROstar® Nano, BMG LABTECH GmbH). Odczyt powtarzano co minutę w ciągu 8 minut.

9.6. Analiza statystyczna

Uzyskane dane w głównej mierze przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm odchylenie standardowe (*ang. SD; Standard Deviation*), wyjątek stanowiły eksperymenty przeprowadzone na osoczu pacjentów z AML, gdzie otrzymane wyniki wyrażono jako średnią arytmetyczną \pm błąd standardowy średniej (*ang. SEM; Standard Error of the Mean*) oraz oznaczenia biologicznej aktywności płytek krwi metodą cytometrii przepływowej, których wyniki przedstawiono w postaci mediany \pm rozstęp ćwiartkowy Q_3-Q_1 („pudełko”), wartość minimalna i maksymalna („wąsy”). Każde doświadczenie przeprowadzono w minimum trzech niezależnych eksperymentach – dokładną liczbę „n” dla analizowanego parametru zamieszczono w legendach rycin i tabel. Program Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Stany Zjednoczone) posłużył we wstępnym opracowaniu danych: obliczenie średnich arytmetycznych, median, wartości SD i SEM.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica v.13.1 (StatSoft Inc, Stany Zjednoczone) [220, 221]. Każdorazowo analizę rozpoczynano od sprawdzenia normalności rozkładu zmiennych testem Shapiro-Wilk’a. Gdy rozkład nie wykazywał cech normalnego wykonywano nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala-Wallis’a z post-hoc: test Dunna. W sytuacji, gdy dane wykazywały normalność rozkładu weryfikowano jednorodność wariancji poprzez zastosowanie testu Levene’a. Na podstawie wyniku testu Levene’a otrzymane dane analizowano testem: ANOVA jednoczynnikowa z post-hoc: test Tukey’a (gdy $p > 0,05$ w teście Levene’a) lub ANOVA rang Kruskal’a-Wallis’a z post-hoc: test Dunna (gdy $p \leq 0,05$ w teście Levene’a). Wartość $p \leq 0,05$ przyjęto jako poziom istotny statystycznie. Przy pomocy testu Grubbs’a zidentyfikowano wyniki odstające obarczone błędem grubym, które usunięto przed analizą statystyczną. Zamieszczone w pracy wykresy przygotowano w programie GraphPad Prism 5.0 Software.

10. Wyniki

10.1. Charakterystyka supernatantów otrzymanych z przechowywanych i świeżych KKCz

10.1.1. Wybrane ilościowe parametry oceny supernatantów

Zrealizowanie postawionego celu badawczego rozpoczęto od scharakteryzowania, wykorzystanych następnie w badaniach, supernatantów uzyskanych z komercyjnych koncentratów krwinek czerwonych w 1. oraz 42. dniu przechowywania. W tym celu oceniono poziom wybranych parametrów, tj. stężenie hemoglobiny, hemu oraz żelaza (Fe^{2+} , Fe^{3+}), oznaczenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego i wielkości populacji mikrocząstek erytrocytarnych w supernatantach. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 10.

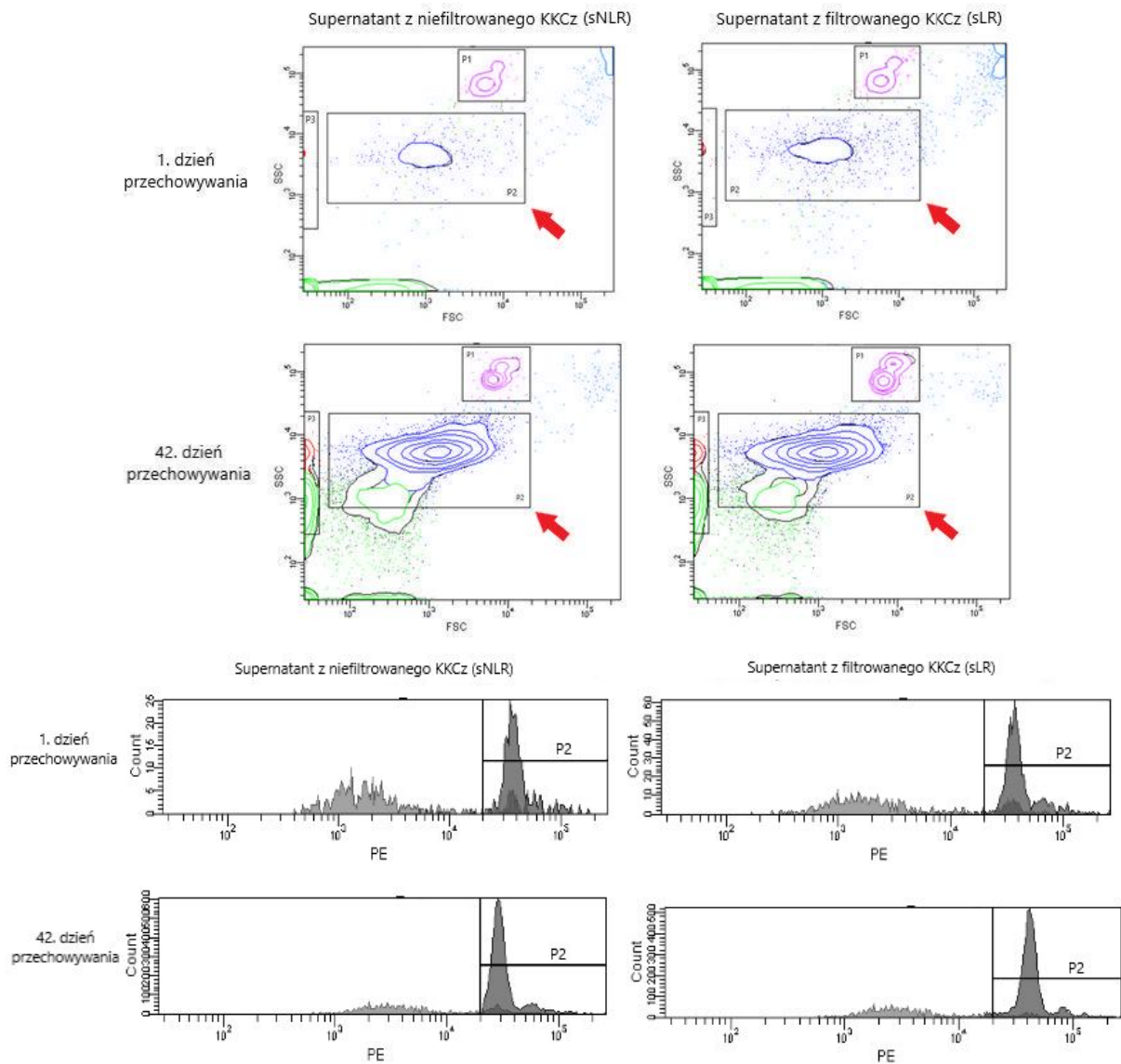
Tabela 10. Charakterystyka supernatantów z KKCz wykorzystanych w badaniach

Parametr	Dzień przechowywania	Supernatant z niefiltrowanego KKCz (sNLR)	Supernatant z filtrowanego KKCz (sLR)
Stężenie hemoglobiny [g/dl]	1	0,046 ± 0,011	0,058 ± 0,013
	42	0,172 ± 0,018 ^(B)	0,104 ± 0,012 ^(A, D)
Stężenie hemu [μM]	1	25,83 ± 4,10	41,06 ± 5,54 ^(C)
	42	414,15 ± 18,06 ^(B)	239,98 ± 9,99 ^(B, D)
Stężenie żelaza [μg/dl]	1	7,16 ± 1,14	9,79 ± 1,08 ^(C)
	42	617,87 ± 42,78 ^(B)	241,76 ± 20,27 ^(B, D)
CPA [mM ekwiwalentów Troloxu]	1	3,12 ± 0,48	3,78 ± 0,45
	42	1,22 ± 0,21 ^(B)	1,66 ± 0,22 ^(B, C)
Populacja mikrocząstek erytrocytarnych [%]	1	7,40 ± 2,13	9,82 ± 2,38
	42	87,12 ± 12,61 ^(B)	69,28 ± 9,84 ^(B, C)

Dane zawarte w tabeli przedstawiają wartości średnie ± SD. (A) $p < 0,01$; (B) $p < 0,001$ wartości istotne statystycznie w porównaniu z 1. dniem przechowywania (sNLR1 vs sNLR42 i sLR1 vs sLR42); (C) $p < 0,05$; (D) $p < 0,001$ wartości istotne statystycznie w tym samym dniu przechowywania w obrębie różnych typów KKCz (sNLR1 vs sLR1 i sNLR42 vs sLR42); $n = 5$.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano istotny statystycznie wzrost stężenia hemoglobiny, hemu oraz żelaza w badanych typach supernatantów wraz z wydłużaniem czasu przechowywania KKCz. Zaobserwowano również, iż w 1. dniu przechowywania wartości oznaczanych parametrów były wyższe w supernatantach pochodzących z filtrowanych KKCz (sLR1) w porównaniu do supernatantów z jednostek niepoddanych leukoredukcji (sNLR1). Natomiast w ostatnim dniu przechowywania poziom wyżej wspomnianych parametrów

był niższy o około 40-60% w supernatantach z filtrowanych KKCz (sLR42) w stosunku do supernatantów otrzymanych z niefiltrowanych jednostek (sNLR42) (Tabela 10).



Rycina 15. Przykładowe reprezentatywne wykresy dot plot (punktowe; parametr FSC versus SSC) oraz histogramy cytometryczne przedstawiające populację mikrocząstek erytrocytarnych (bramka P2 oznaczona strzałką) w supernatancie otrzymanym z niefiltrowanej oraz poddanej leukoredukcji jednostki KKCz w 1. oraz 42. dniu przechowywania. Bramka P1 - kulki kalibracyjne o średnicy 2,0 μm .

W sNLR42 oraz sLR42 zaobserwowano ok. 4-krotny ($p < 0,001$) i 2-krotny ($p < 0,01$) wzrost stężenia hemoglobiny w porównaniu z dniem 1. W czasie przechowywania stężenie hemu wzrosło 16-krotnie ($p < 0,001$) w sNLR oraz 6-krotnie ($p < 0,001$) w sLR, zaś stężenie żelaza wzrosło aż 85-krotnie ($p < 0,001$) w sNLR i 25-krotnie ($p < 0,001$) w sLR. Poziom wolnej hemoglobiny i stężenie hemu w sLR42 było o około 40% niższe ($p < 0,001$) niż w sNLR42, z kolei stężenie żelaza na poziomie aż 60% niższym ($p < 0,001$). W sLR na początku

przechowywania w porównaniu do sNLR wykazano znamiennej statystycznie ($p < 0,05$) wzrost stężenia hemu (o ok. 59%) i żelaza (o ok. 37%) (Tabela 10).

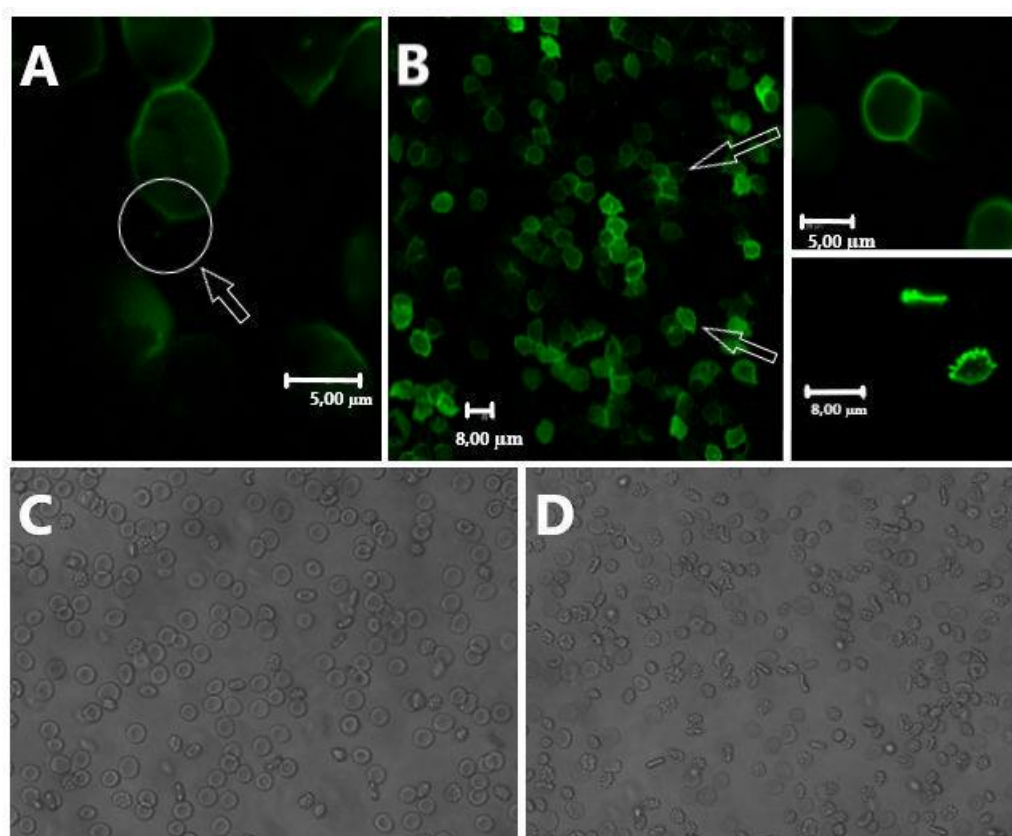
Wraz z wydłużaniem czasu przechowywania w badanych supernatantach nastąpił ponad 2-krotny ($p < 0,001$) spadek całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA). Stwierdzono istotnie statystycznie ($p < 0,05$) wyższą wartość CPA w sLR42 w porównaniu sNLR42 (Tabela 10).

Na podstawie przeprowadzonego znakowania przeciwciałami anti-CD235a/PE stwierdzono znaczące zwiększenie ($p < 0,001$) populacji mikrocząstek erytrocytarnych (EMPs) w badanych supernatantach w 42. dniu przechowywania, zarówno w sNLR42 (ok. 11-krotnie) jak i sLR42 (ok. 7-krotnie) (Tabela 10, Rycina 15). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w wielkości populacji EMPs w sNLR1 w stosunku do sLR1. Zauważono natomiast, że populacja EMPs w sLR42 jest mniejsza (o ok. 20%; $p < 0,05$) w porównaniu z sNLR42 (Tabela 10).

10.1.2. Uwalnianie mikrocząstek erytrocytarnych

Obrazowanie wyznakowanych barwnikiem fluorescencyjnym (Neuro-DiO, Biotium, Inc.) błon komórek pochodzących z komercyjnych ubogoleukocytarnych KKCz przeprowadzone przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego umożliwiło wizualizację procesu uwalniania EMPs oraz obserwację zmian morfologicznych krwinek czerwonych wynikających z przechowywania w warunkach *ex vivo* (Rycina 16).

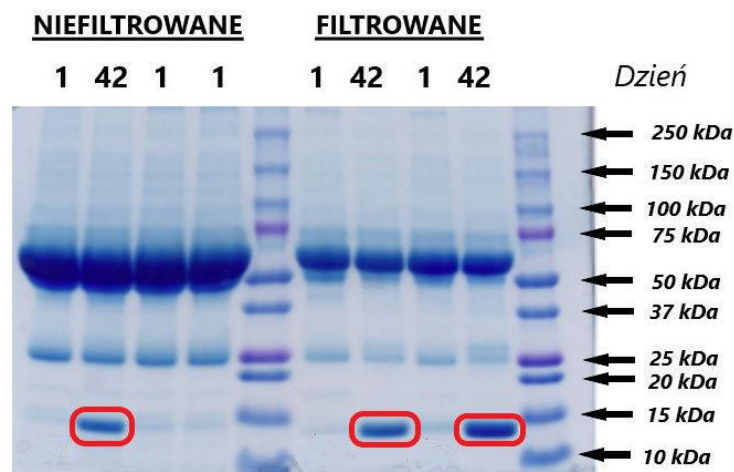
Na przedstawionych zdjęciach z mikroskopu kontrastowo-fazowego (Rycina 16C i D) wyraźnie widać, iż w trakcie przechowywania znacząco zwiększa się ilość krwinek czerwonych o morfologii zbliżonej do sferochinocytów (charakterystyczne wypustki na powierzchni komórek – przekształcenie nieodwracalne), zaś zmniejsza liczba komórek o morfologii dyskocyту (kształt prawidłowy). Fotografie otrzymane przy wykorzystaniu metody fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej potwierdziły zaobserwowane pod mikroskopem świetlnym zmiany morfologiczne krwinek czerwonych zachodzące w KKCz oraz umożliwiły zobrazowanie procesu uwalniania EMP (Rycina 16A i B).



Rycina 16. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące: proces uwalniania EMP przez krwinkę czerwoną (A) oraz zmiany morfologiczne erytrocytów (B) w UKKCh wykonane przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego z wykorzystaniem barwnika Neuro-DiO (Biotium, Inc.). Przed obrazowaniem komórki nie były utrwalane. Dodatkowo zamieszczono obrazy UKKCh z mikroskopu kontrastowo-fazowego o odwróconej optyce (Axio Observer.D1, Carl Zeiss; powiększenie 600x) (C – dzień 1; D – dzień 42).

10.1.3. Rozdział elektroforetyczny białek

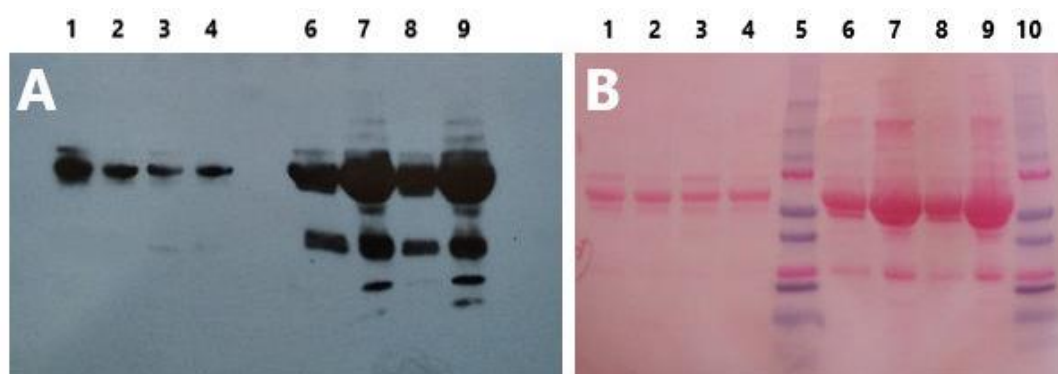
Na podstawie otrzymanych elektroferogramów wykazano obecność białka o masie cząsteczkowej ok. 15 kDa uwalnianego do supernatantu w trakcie przechowywania krwinek czerwonych (Rycina 17), które (zgodnie z danymi literaturowymi) odpowiada masie łańcuchów polipeptydowych (globin) wchodzących w skład Hb [131]. Pasma to jest charakterystyczne dla obu typów supernatantów i świadczy o znaczącym uwalnianiu Hb przez komórki w trakcie przechowywania w warunkach *ex vivo*. Supernatanty pochodzące z niefiltrowanych jednostek KKCz, niezależnie od dnia otrzymania, charakteryzowały się większą ilością białka, szczególnie w paśmie o masie ok. 66 kDa (pasmo odpowiadające masie albuminy [131]). W obu typach supernatantów niezależnie od dnia otrzymania zaobserwowano również pasmo białkowe o masie cząsteczkowej ok. 25 kDa, które może pochodzić od peroksyredoksyny-2 [222] lub lateksyny [131]).



Rycina 17. Obraz elektroforetyczny białek obecnych w supernatantach KKCz w 1. oraz 42. dniu przechowywania. Kolorem czerwonym zaznaczono pasmo odpowiadające łańcuchowi Hb (~15 kDa), które zaobserwowano w ostatnim dniu przechowywania w obu typach supernatantów. Zamieszczony elektroferogram przedstawia reprezentatywny rozdział elektroforetyczny otrzymany w jednym z kilkunastu wykonanych niezależnych doświadczeniach.

10.1.4. Detekcja grup karbonylowych

W białkach obecnych w supernatantach pochodzących z KKCz dokonano detekcji grup karbonylowych (marker stresu oksydacyjnego) techniką Western blot (Rycina 18). W supernatantach modyfikacjom oksydacyjnym ulega w głównej mierze białko o masie cząsteczkowej ~66 kDa, odpowiadające albuminie, która pochodzi z resztkowych ilości osocza obecnych w KKCz. W sNLR utlenieniu ulegają również białka o masach cząsteczkowych ok. 25 kDa (niezależnie od dnia otrzymania) i 15 kDa (tylko w supernatantach z 42. dnia). W sLR nie wykryto obecności grup karbonylowych w innych białkach niż o masie cząsteczkowej ok. 66 kDa.



Rycina 18. Detekcja grup karbonylowych techniką Western blot w białkach supernatantów KKCz. (A) Membranę nietrwale wybarwiono w 0,1% roztworze czerwieni Ponceau w 5% kwasie octowym (B) Zamieszczona rycina przedstawia reprezentatywny obraz otrzymany w jednym z kilku wykonanych niezależnych doświadczeniach. (1-4) supernatant filtrowanych KKCz (1, 3 – dzień 1; 2, 4 – dzień 42); (6-9) supernatant niefiltrowanych KKCz (6, 8 – dzień 1; 7, 9 – dzień 42); (5, 10) wzorzec Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad).

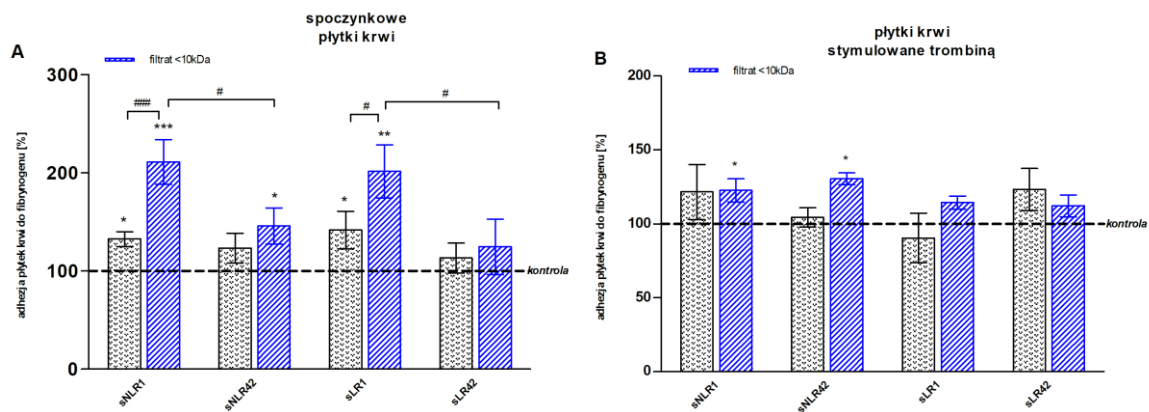
10.2. Ocena parametrów czynnościowych płytek krwi po uprzedniej inkubacji z supernatantami KKCz

10.2.1. Adhezja płytek krwi

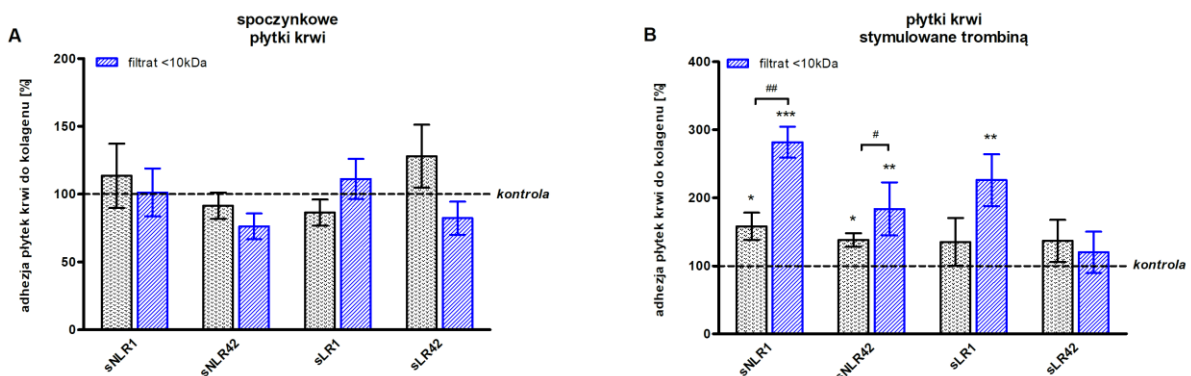
Adhezja płytek krwi do białek adhezyjnych obecnych w podśródbłonkowej tkance łącznej jest pierwszym etapem wieloetapowego procesu hemostazy pierwotnej i aktywacji płytek krwi. Pierwszym etapem oceny parametrów czynnościowych płytek krwi po inkubacji z supernatantami było badanie zdolności adhezyjnych niestymulowanych oraz aktywowanych trombiną płytek krwi statyczną metodą spektrofotometryczną. Oceniano przyleganie wyizolowanych z krwi, zawieszonych w buforze Tyroda, płytek krwi do fibrynogenu i kolagenu typu I. Wyniki przedstawione na Rycinie 19A wskazują na zwiększoną adhezję do fibrynogenu spoczynkowych płytek krwi po inkubacji z supernatantem pochodzącym zarówno z niefiltrowanych, jak i filtrowanych jednostek KKCz otrzymanych w 1. dniu przechowywania (odpowiednio o ok. 33% i o 41%; $p < 0,05$) w stosunku do nietraktowanych płytek krwi (kontrola). Zaobserwowano, że filtry uzyskane z supernatantów otrzymanych w 1. dniu przechowywania znacząco zwiększały adhezję płytek krwi do fibrynogenu w porównaniu do supernatantów, z których zostały otrzymane (filtrat z sNLR1 o ok. 60% ($p < 0,001$), a z sLR1 o 42% ($p < 0,05$)). Supernatanty KKCz po 42. dniach przechowywania, ani filtrat otrzymany z sLR42, nie wpływały na adhezję płytek spoczynkowych do fibrynogenu (Rycina 19A). Po pobudzeniu płytek krwi fizjologicznym agonistą (trombina; stężenie końcowe 0,1 U/ml) zaobserwowano około 30% wzrost ($p < 0,05$) zdolności adhezyjnych płytek, które były traktowane filtratami uzyskanymi z sNLR1 i sNLR42 w porównaniu do kontroli (płytki nietraktowane badanymi supernatantami stymulowane trombiną; Rycina 19B).

Adhezja pre-inkubowanych z supernatantami KKCz i ich filtratami spoczynkowych płytek krwi do kolagenu nie uległy zmianie w porównaniu do kontroli (płytki nietraktowane badanymi supernatantami; Rycina 20A). Po pobudzeniu trombiną wykazano zwiększone właściwości adhezyjne płytek uprzednio potraktowanych supernatantem sNLR1 (o ok. 58%) i jego filtratem (ok. 2,8-krotnie; $p < 0,001$), sNLR42 (o ok. 38%) i jego filtratem (o ok. 85%; $p < 0,01$) i filtratem otrzymanym z sLR1 (ok. 2,2-krotnie; $p < 0,01$) w stosunku do kontroli (płytki nietraktowane badanymi supernatantami stymulowane trombiną; Rycina 20B). Podsumowując, filtry uzyskane z supernatantów pochodzących z jednostek KKCz niepoddanych leukoredukcji znacząco zwiększały adhezję płytek krwi w porównaniu do supernatantów, z których zostały otrzymane. Wyniki te sugerują, iż za zwiększoną reaktywność płytek krwi

po inkubacji z supernatantami, a następnie stymulacji fizjologicznym agonistą, mogą w głównej mierze odpowiadać cząsteczki o wielkości poniżej 10 kDa obecne w supernatantach.



Rycina 19. Adhezja płytek krwi, pre-inkubowanych (37°C, 15 min.) z supernatantami lub ich filtratami, zawierającymi cząsteczki o masie poniżej 10 kDa, (A: spoczynkowych oraz B: stymulowanych trombiną w stężeniu końcowym 0,1 U/ml) do fibrynogenu (0,1 mg/ml). Dane na wykresach przedstawiają wartości średnich arytmetycznych ± SD. Wyniki przeliczono w stosunku do kontroli (płytki krwi nietraktowane), których stopień adhezji przyjęto za 100%. */# p<0,05; ** p<0,01; ### p<0,001; n = 34 (płytki krwi wyizolowano od 10 różnych dawców).

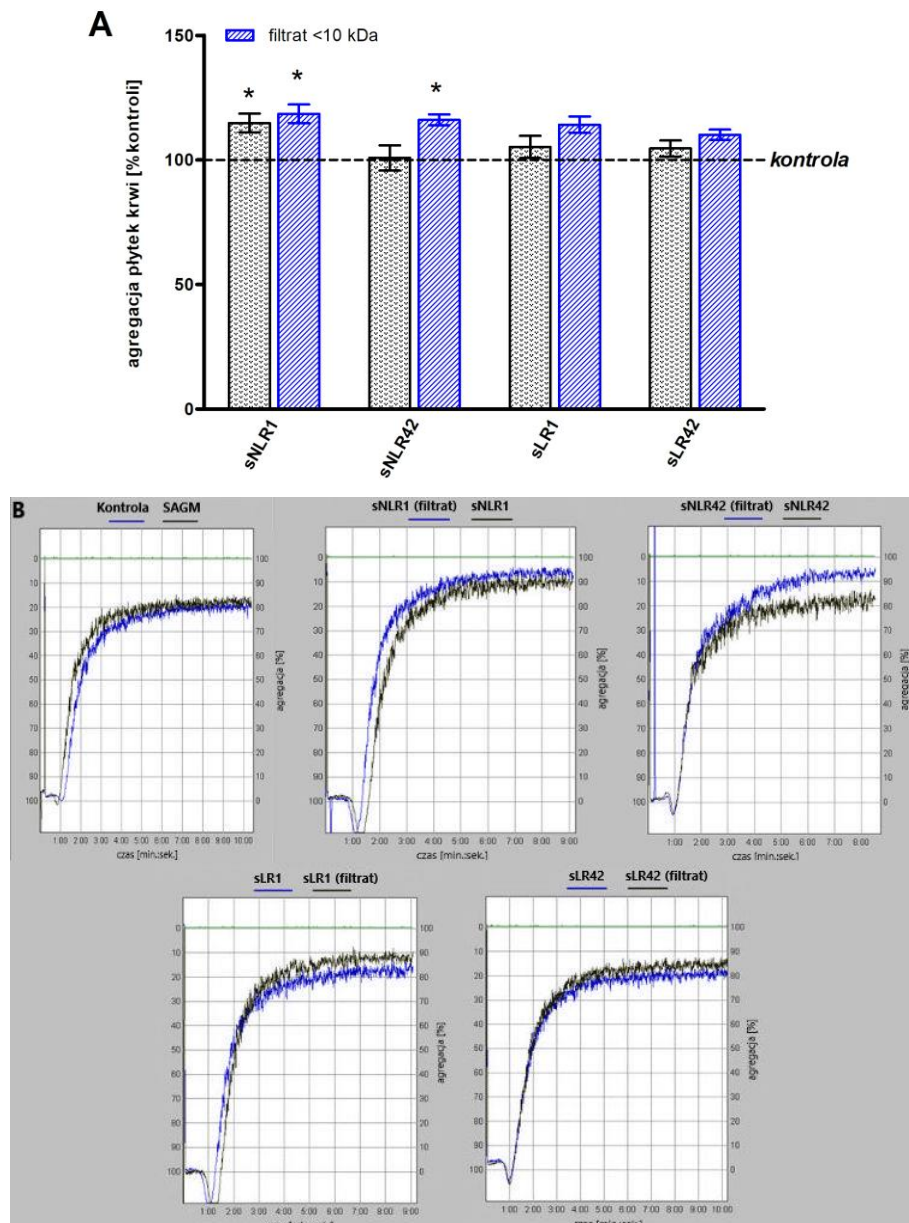


Rycina 20. Adhezja płytek krwi, pre-inkubowanych (37°C, 15 min.) z supernatantami lub ich filtratami (A: spoczynkowych oraz B: stymulowanych trombiną w stężeniu końcowym 0,1 U/ml) do kolagenu (0,02 mg/ml). Dane na wykresach przedstawiają wartości średnich arytmetycznych ± SD. Wyniki przeliczono w stosunku do kontroli (płytki krwi nietraktowane), których poziom adhezji przyjęto za 100%. # p<0,05; **/### p<0,01; *** p<0,001; n = 34 (płytki krwi wyizolowano od 10 różnych dawców).

10.2.2. Agregacja płytek krwi

W celu sprawdzenia czy substancje gromadzące się w supernatantach podczas przechowywania KKCz *ex vivo* wpływają na tworzenie agregatów płytkowych przeprowadzono pomiar agregacji płytek krwi metodą turbidymetryczną w osoczu bogatopłytkowym uprzednio inkubowanym z supernatantami lub ich filtratami, a następnie

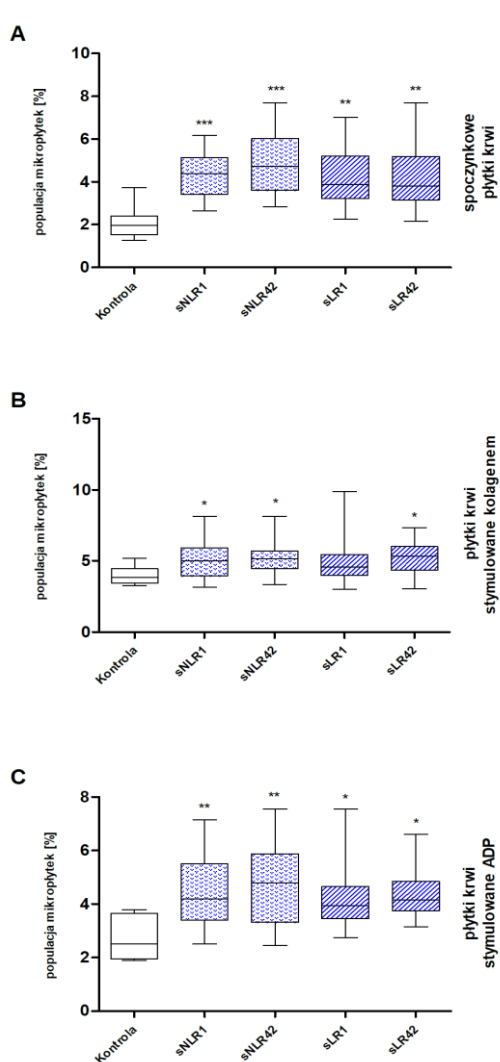
stymulowanych fizjologicznym agonistą, kolagenem w stężeniu końcowym 2 $\mu\text{g/ml}$. Wyniki przedstawione na Rycinie 21A pokazują, że sNLR1 (o 15%), a także jego filtrat (o 18%) oraz filtrat sNLR42 (o 16%) istotnie ($p < 0,05$) zwiększały stopień agregacji płytek krwi w porównaniu do kontroli. Agregacja płytek kontrolnych po aktywacji kolagenem osiągała wartość około 82%. Nie wykazano znamienych statystycznie różnic pomiędzy kontrolą (PRP) a kontrolą z dodatkiem płynu wzbogacającego SAGM (PRP uprzednio inkubowane z 50 μl płynu SAGM – dane niezamieszczone).



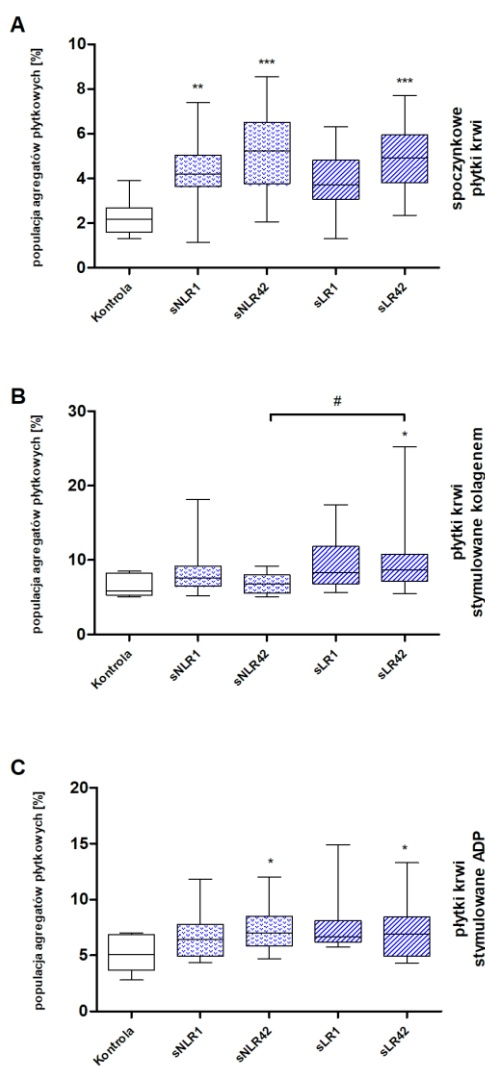
Rycina 21. Agregacja płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym uprzednio inkubowanym (37°C, 15 min.) z supernatantami lub ich filtratami indukowana fizjologicznym agonistą - kolagenem (2 $\mu\text{g/ml}$) (A) Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD (% kontroli), gdzie za 100% przyjęto stopień agregacji komórek kontrolnych (nieaktwowanych). * $p < 0,05$; $n = 53$ (17 różnych dawców). (B) Przykładowe reprezentatywne wykresy przebiegu procesu agregacji płytek krwi zarejestrowane w agregometrze optycznym Chrono-Log® 490.

10.2.3. Biologiczna aktywność płytek krwi

W następnej kolejności oceniono zmiany poziomu aktywacji i reaktywności płytek krwi (odpowiedź na działanie fizjologicznych agonistów: 20 $\mu\text{g/ml}$ kolagenu i 20 μM ADP) w warunkach bardziej zbliżonych do fizjologicznych - metodą cytometrii przepływowej w pełnej krwi wcześniej poddanej działaniu supernatantów KKCz.



Rycina 22. Analiza cytometryczna odsetka mikroplatek [%] w puli płytek krwi spoczynkowych (A), stymulowanych kolagenem (20 $\mu\text{g/ml}$; B) oraz ADP (20 μM ; C). Krew pełną uprzednio inkubowano z supernatantami (37°C, 15 min.). Nie wykazano znamiennej statystycznie różnicy ($p > 0,05$) pomiędzy kontrolą (krew pełna) a kontrolą z SAGM. Wyniki przedstawiono w postaci mediany \pm rozstęp ćwiartkowy Q3-Q1 („pudełko”), wartość minimalną i maksymalną („wąsy”). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n = 44 (10 różnych dawców krwi).

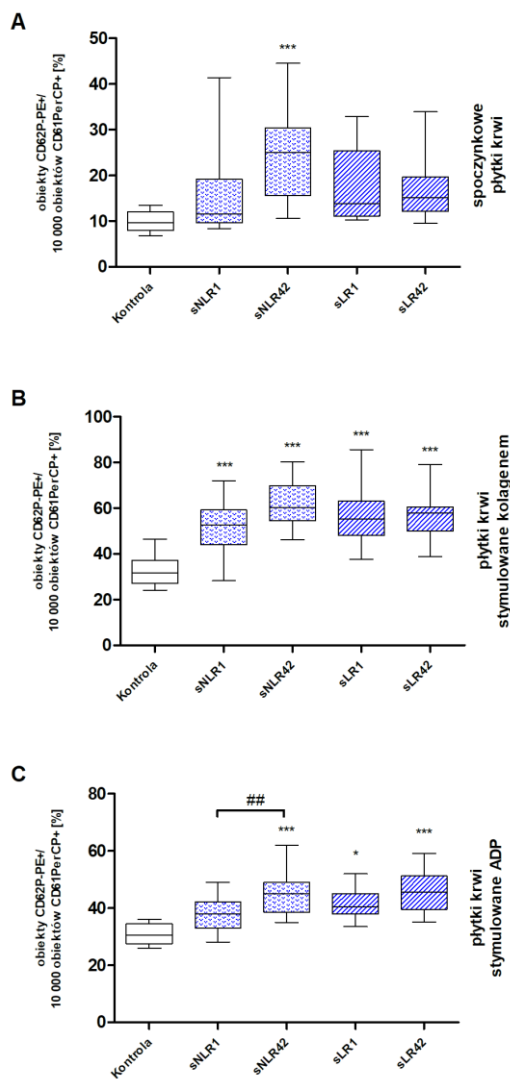


Rycina 23. Analiza cytometryczna odsetka agregatów płytkowych [%] w puli płytek krwi spoczynkowych (A), stymulowanych kolagenem (20 $\mu\text{g/ml}$; B) oraz ADP (20 μM ; C). Krew pełną uprzednio inkubowano z supernatantami (37°C, 15 min.). Nie wykazano znamiennej statystycznie różnicy ($p > 0,05$) pomiędzy kontrolą (krew pełna) a kontrolą z SAGM. Wyniki przedstawiono w postaci mediany \pm rozstęp ćwiartkowy Q3-Q1 („pudełko”), wartość minimalną i maksymalną („wąsy”). */# $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n = 44 (10 różnych dawców krwi).

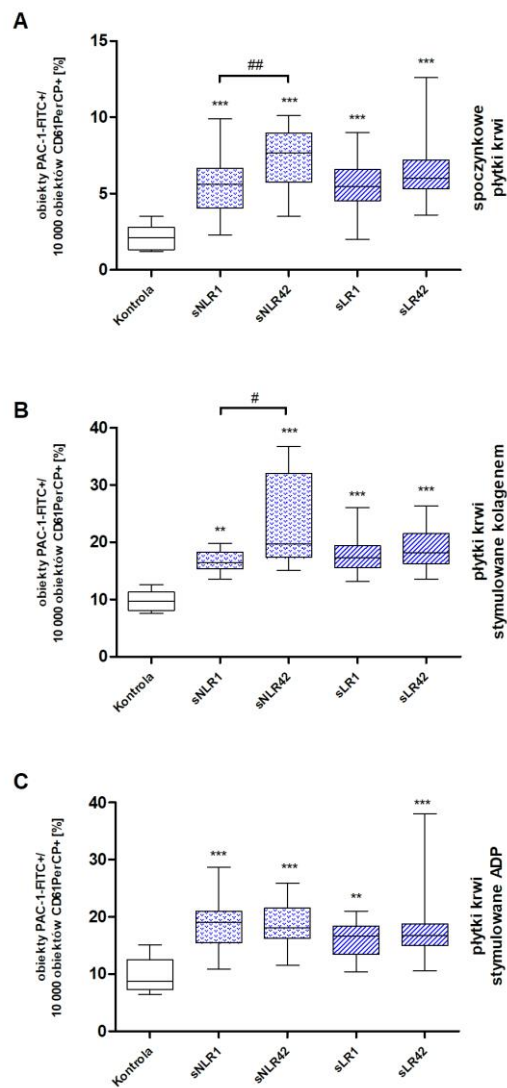
Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano ponad 2-krotne zwiększenie ($p < 0,001$) populacji mikroplatek w krwi pełnej uprzednio inkubowanej z supernatantami niefiltrowanych KKCz (2,2-krotne dla sNLR1 oraz 2,5-krotne dla sNLR42), w porównaniu z kontrolą (Rycina 22A). Natomiast w próbkach krwi traktowanych supernatantami filtrowanych KKCz (sLR) zaobserwowano około 2-krotnie ($p < 0,01$) wyższą liczbę mikroplatek, niezależnie od dnia przechowywania składnika krwi. Wzrost populacji agregatów płytkowych zaobserwowano w krwi pełnej traktowanej supernatantami z 42. dnia ($p < 0,001$), odpowiednio 2,4-krotny dla sNLR42 oraz 2,2-krotny dla sLR42, w porównaniu do kontroli (Rycina 23A). Istotnie statystycznie zwiększyła się również ilość agregatów po inkubacji z sNLR1 ($p < 0,01$).

W spoczynkowych płytkach krwi traktowanych supernatantami KKCz stwierdzono około 3-krotny ($p < 0,001$) wzrost aktywnej formy receptora GP IIb/IIIa na powierzchni płytek krwi w stosunku do płytek kontrolnych (Rycina 25A). Najwyższy poziom tego markera aktywacji płytek zaobserwowano po inkubacji krwi pełnej z sNLR42 (ok. 3,7-krotny wzrost ($p < 0,001$) w porównaniu do kontroli oraz o ok. 40% wzrost ($p < 0,01$) w porównaniu do sNLR1). Dodatkowo, sNLR42 zwiększał ok. 2,6-krotnie ($p < 0,001$) ekspresję powierzchniowej selektyny P w stosunku do płytek kontrolnych (nietraktowanych) (Rycina 24A).

Metodą cytometrii przepływowej oceniono również odpowiedź płytek krwi na działanie fizjologicznych agonistów (kolagen, ADP) po uprzedniej inkubacji krwi pełnej z supernatantami. Po aktywacji kolagenem zaobserwowano wzrost populacji mikroplatek o ok. 35% ($p < 0,05$) w próbkach traktowanych sNLR42 i sLR42 oraz sNLR1 w porównaniu do płytek kontrolnych (Rycina 22B). Istotny statystycznie wzrost odsetka agregatów płytkowych ($p < 0,05$) wykazano po inkubacji krwi z sLR42 w stosunku do próby kontrolnej (nietraktowanej) (Rycina 23B). Ilość agregatów płytkowych oznaczona po inkubacji z sNLR42 była znamienne mniejsza w porównaniu do odsetka agregatów po potraktowaniu sLR42. W płytkach stymulowanych kolagenem (uprzednio traktowanych supernatantami) zauważono ok. 2-krotny wzrost ekspresji selektyny P ($p < 0,001$) oraz istotny wzrost aktywnej formy GP IIb/IIIa ($p < 0,001$; w przypadku sNLR1 o 70%: $p < 0,01$) w porównaniu do kontroli (Rycina 24B, Rycina 25B). Najwyższy poziom aktywnej formy receptora GP IIb/IIIa zaobserwowano w próbkach krwi poddanych działaniu sNLR42 i był on również znamienne wyższy w porównaniu do sNLR1 ($p < 0,05$).



Rycina 24. Analiza cytometryczna ekspresji selektyny P na powierzchni płytek krwi spoczynkowych (A), stymulowanych kolagenem (20 $\mu\text{g/ml}$; B) oraz ADP (20 μM ; C). Krew pełną uprzednio inkubowano z supernatantami (37°C, 15 min.). Nie wykazano znamienych statystycznie różnic ($p > 0,05$) pomiędzy kontrolą (krew pełna) a kontrolą z SAGM. Wyniki przedstawiono w postaci mediany \pm rozstęp ćwiartkowy Q_3-Q_1 („pudełko”), wartość minimalna i maksymalna („wąsy”). * $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 44$ (10 różnych dawców krwi).

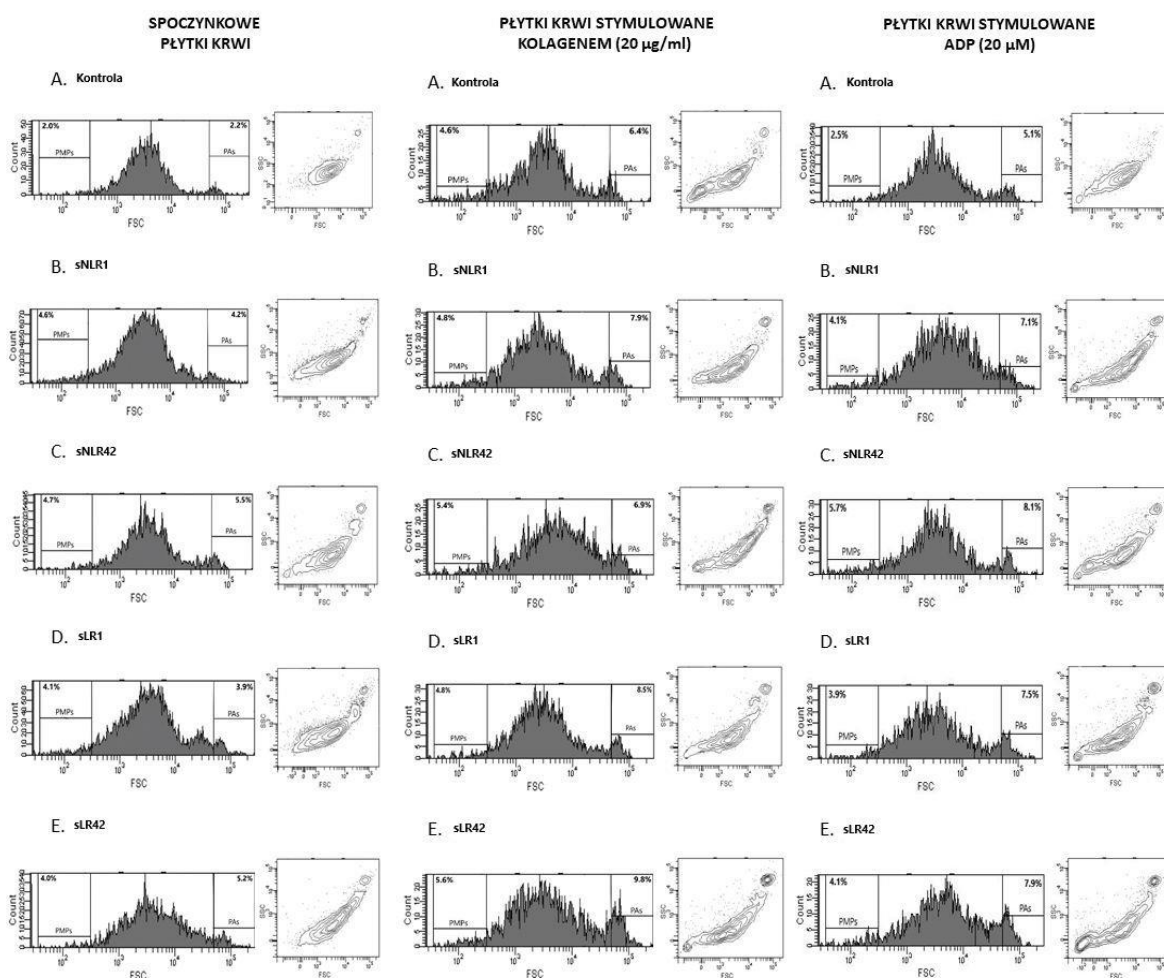


Rycina 25. Analiza cytometryczna ekspresji aktywnej formy GP IIb/IIIa na powierzchni płytek krwi spoczynkowych (A), stymulowanych kolagenem (20 $\mu\text{g/ml}$; B) oraz ADP (20 μM ; C). Krew pełną uprzednio inkubowano z supernatantami (37°C, 15 min.). Nie wykazano znamienych statystycznie różnic ($p > 0,05$) pomiędzy kontrolą (krew pełna) a kontrolą z SAGM. Wyniki przedstawiono w postaci mediany \pm rozstęp ćwiartkowy Q_3-Q_1 („pudełko”), wartość minimalna i maksymalna („wąsy”). # $p < 0,05$; **/### $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 44$ (10 różnych dawców krwi).

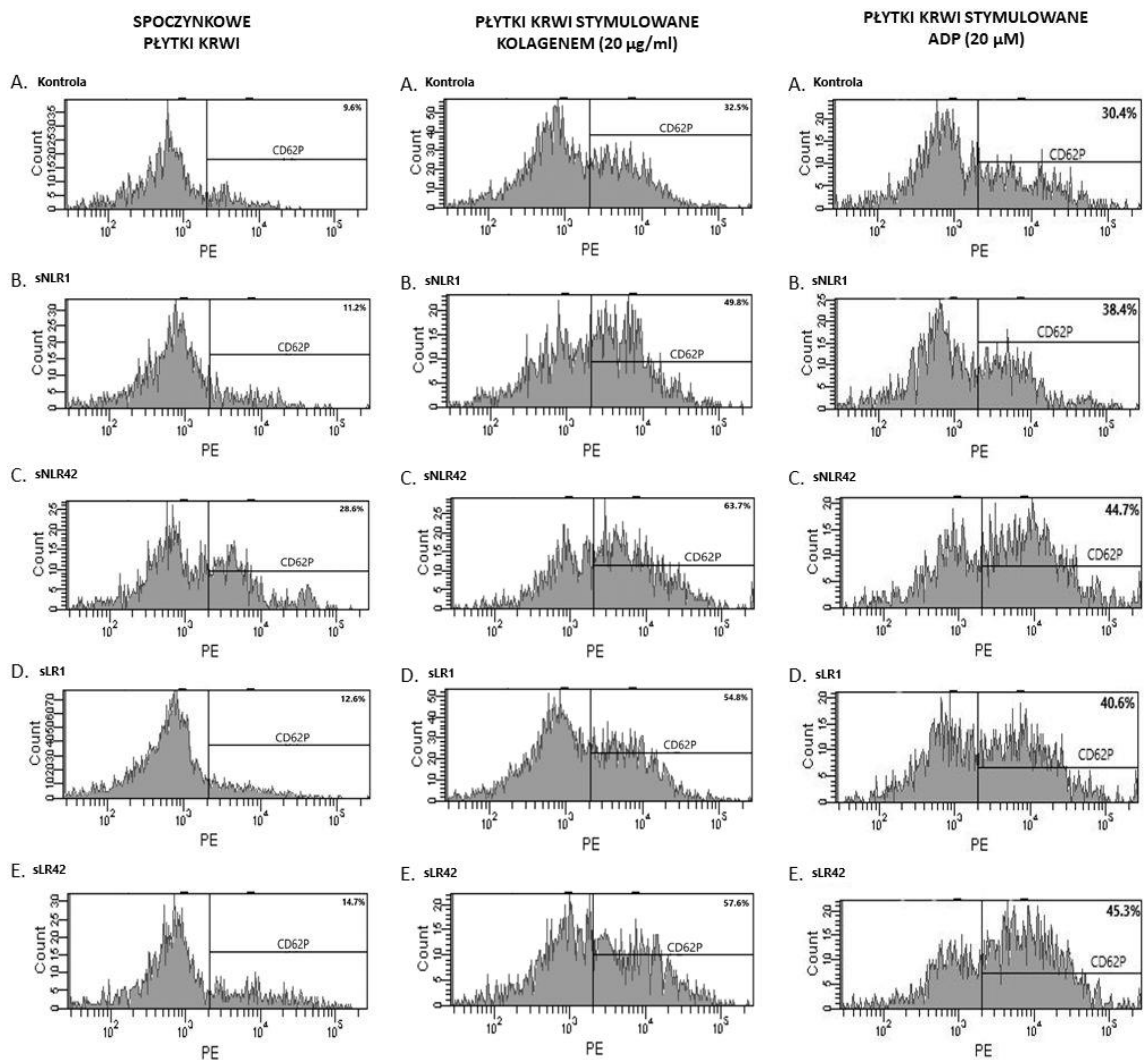
W populacji płytek krwi aktywowanych ADP odnotowano wzrost odsetka mikroplatek (sNLR: o 80%; sLR: o 62%) spowodowany działaniem supernatantów KKCz (sNLR: $p < 0,01$; sLR: $p < 0,05$) oraz zwiększenie puli agregatów płytkowych (o 40%; $p < 0,05$) pod wpływem sNLR42 i sLR42 w stosunku do płytek kontrolnych (Rycina 22C, Rycina 23C).

Zaobserwowano także, że sNLR42 i sLR42 oraz sLR1 zwiększają odpowiednio o ok. 70% ($p < 0,001$) oraz o 40% ($p < 0,05$) ekspresję powierzchniowej selektyny P (Rycina 24C). Znamiennej statystycznie wzrost poziomu selektyny P po 42 dniach przechowywania KKCz, w porównaniu z dniem 1, wykazano w przypadku supernatantów otrzymanych z jednostek niepoddanych leukoredukcji. Po stymulacji ADP wykazano ponad 2-krotny ($p < 0,001$; dla sLR1 o 90%; $p < 0,01$) wzrost aktywnej formy receptora GP IIb/IIIa na powierzchni płytek krwi poddanych działaniu supernatantów w porównaniu do kontroli (Rycina 25C).

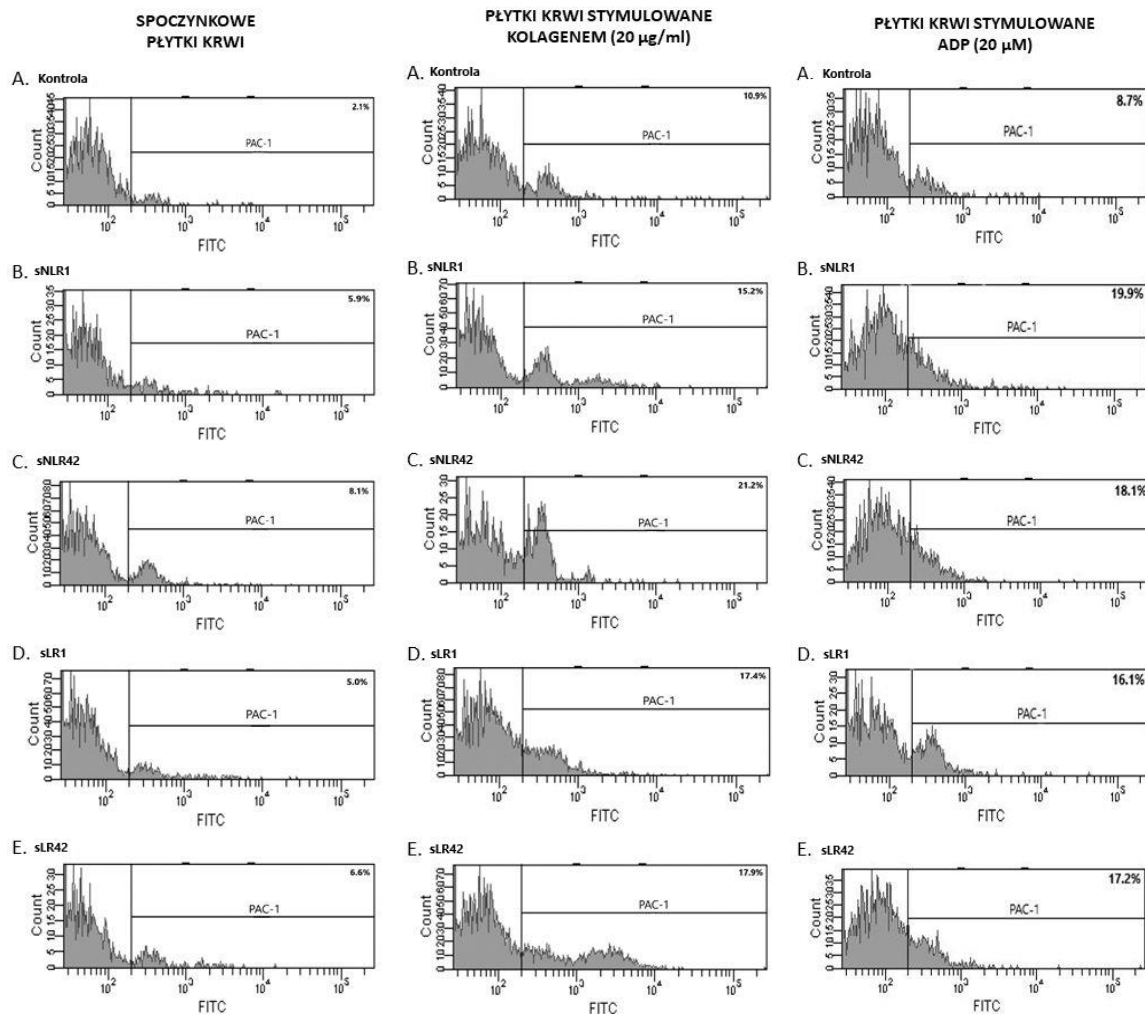
Poniżej przedstawiono przykładowe reprezentatywne wykresy punktowe (dot plot; parametr FSC *versus* SSC) oraz histogramy cytometryczne badanych parametrów, które otrzymano bezpośrednio podczas pomiaru w cytometrze przepływowym model LSR[®] II firmy Becton Dickinson (Rycina 26, Rycina 27, Rycina 28).



Rycina 26. Przykładowe reprezentatywne wykresy punktowe (dot plot) oraz histogramy cytometryczne przedstawiające sposób bramkowania puli mikroplatek (*ang.* PMPs; *platelet-derived microparticles*) i agregatów płytkowych (*ang.* PAs; *platelet aggregates*) w populacji płytek krwi niebudzonych oraz stymulowanych fizjologicznymi agonistami (20 µg/ml kolagenem; 20 µM ADP) po uprzedniej inkubacji z badanymi supernatantami KKCz. Zastosowano antygen CD61, receptor błonowy obecny na powierzchni płytek krwi, który pozwala odróżnić różne subpopulacje płytek od innych komórek obecnych w badanych próbkach. Każdorazowo mierzono fluorescencję 10 000 obiektów CD61/PerCP-pozytywnych.



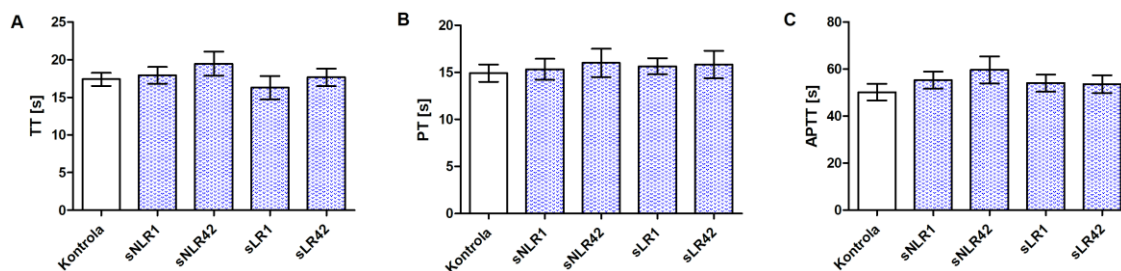
Rycina 27. Przykładowe reprezentatywne histogramy cytometryczne przedstawiające poziom ekspresji selektyny P na powierzchni płytek krwi (sposób bramkowania) niepobudzonych oraz stymulowanych fizjologicznymi agonistami (20 µg/ml kolagenem; 20 µM ADP) po uprzedniej inkubacji z badanymi supernatantami KKCz. Ilość obiektów CD62P/PE-pozytywnych wyrażono jako procent całkowitej liczby płytek krwi (10 000 obiektów CD61/PerCP-pozytywnych).



Rycina 28. Przykładowe reprezentatywne histogramy cytometryczne przedstawiające poziom ekspresji aktywnej formy receptora GP IIb/IIIa na powierzchni płytek krwi (sposób bramkowania) niepobudzonych oraz stymulowanych fizjologicznymi agonistami (20 µg/ml kolagenem; 20 µM ADP) po uprzedniej inkubacji z badanymi supernatantami KKCz. Ilość obiektów PAC-1/FITC-pozytywnych wyrażono jako procent całkowitej liczby płytek krwi (10 000 obiektów CD61/PerCP-pozytywnych).

10.2.4. Oznaczenia koagulometryczne

Ostatnim etapem w celu realizacji postawionego zadania badawczego było wykonanie standardowych pomiarów koagulometrycznych. Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń zapomocą koagulometru Kselmed Optic K-3002, tj. pomiar czasu trombinowego (TT), czasu protrombinowego (PT) oraz czasu kaolinowo-kefalinowego (APTT) osocza nie wykazano istotnych statystycznie różnic w badanych parametrach po uprzedniej inkubacji (37°C, 15 min.) osocza z supernatantami KKCz (Rycina 29).



Rycina 29. Pomiar czasu trombinowego (TT; A), protrombinowego (PT; B) oraz kaolinowo-kefalinowego (APTT; C) osocza uprzednio inkubowanego z supernatantami. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SD; n = 53 (17 różnych dawców krwi).

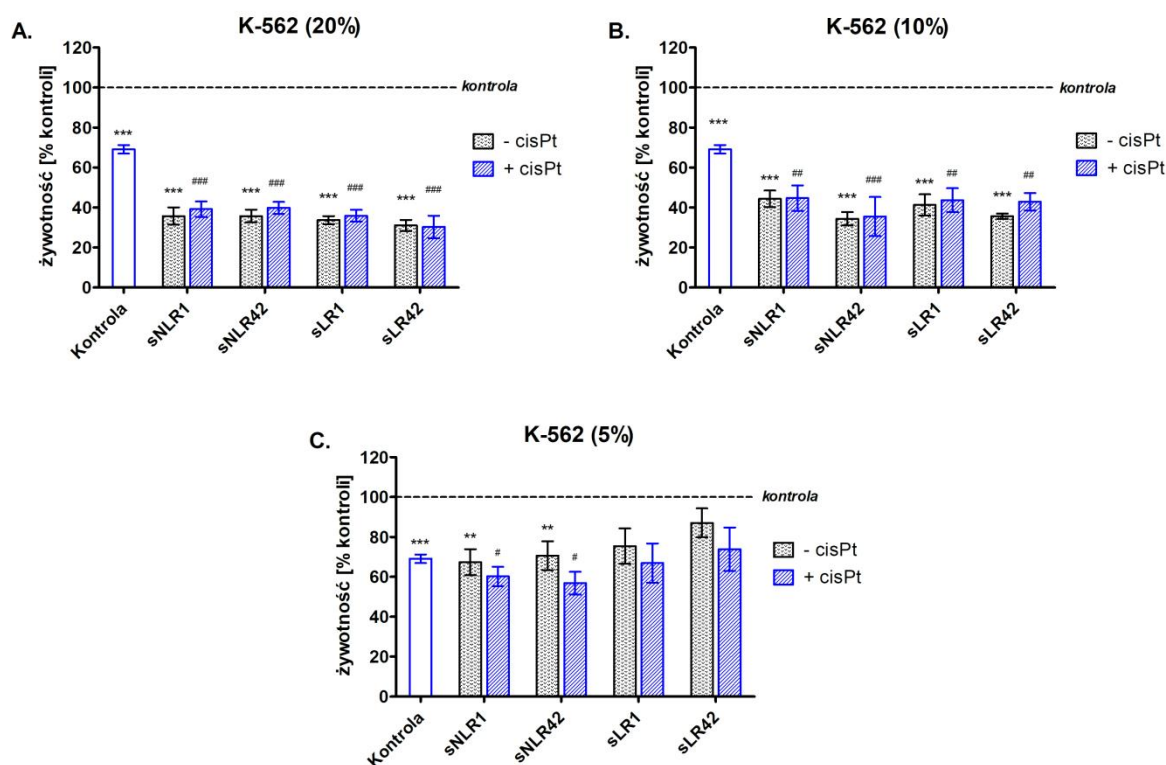
10.3. Ocena działania supernatantów KKCz na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych

10.3.1. Linia K-562 – przewlekła białaczka szpikowa (CML)

10.3.1.1. Przeżywalność komórek

Pierwszym etapem w celu realizacji drugiego zadania badawczego była ocena przeżywalności komórek ludzkiej linii przewlekłej białaczki szpikowej (K-562) po 24-godzinnej inkubacji z badanymi supernatantami KKCz w obecności leku przeciwnowotworowego oraz w układzie bez jego dodatku. Wyniki przedstawione na Rycinie 30A wyraźnie wskazują na spadek żywotności komórek linii K-562 po inkubacji z supernatantami (20%) w porównaniu do kontrolnych komórek nietraktowanych (o ok. 67%; $p < 0,001$) oraz kontrolnych traktowanych cisPt (o ok. 35%; $p < 0,001$). Podobny efekt zaobserwowano po inkubacji z supernatantami w ilości 10% na dołek (Rycina 30B: 60% ($p < 0,001$) spadek żywotności komórek względem kontroli nietraktowanej oraz 30% ($p < 0,01$; w przypadku sNLR42 $p < 0,001$) spadek żywotności w stosunku do komórek inkubowanych z cisPt). W związku z silnym działaniem cytotoksycznym supernatantów na badane komórki (niezależnie od rodzaju supernatantu) przeprowadzono doświadczenia z mniejszą ilością supernatantu w dołku (5% i 2%). Po 24-godzinnej hodowli komórek z 5% zawartością supernatantu sNLR1 oraz sNLR42 w dołku wykazano istotny statystycznie spadek (o ok. 31%; $p < 0,01$) przeżywalności komórek względem kontroli negatywnej (komórki nietraktowane) oraz o ok. 12% ($p < 0,05$) w porównaniu do komórek inkubowanych z cisPt (Rycina 30C). Supernatanty z filtrowanych KKCz nie wykazywały działania na komórki linii K-562 (w układzie z dodatkiem cisPt oraz bez leku przeciwnowotworowego). Wyniki uzyskane

z eksperymentów przeprowadzonych z 2% stężeniem supernatantu nie dowiodły znamiennej statystycznie zmian w przeżywalności komórek (dane niezamieszczone) dlatego 5% supernatantu przyjęto jako ilość optymalną do dalszych doświadczeń.

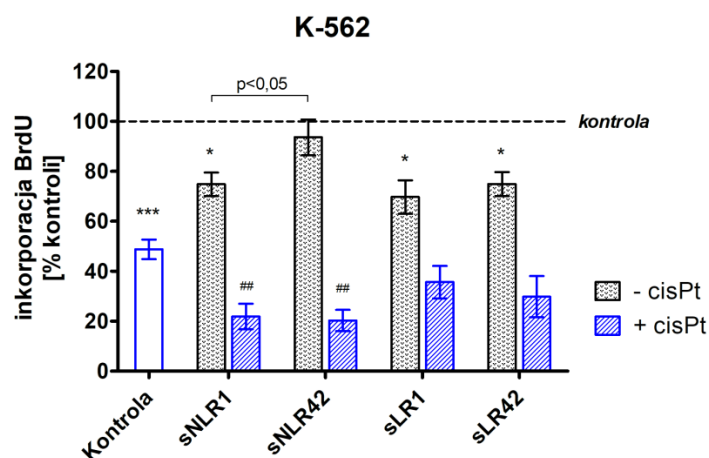


Rycina 30. Przeżywalność komórek linii K-562 po 24-godzinnej inkubacji z supernatantami (20%, 10%, 5%) z dodatkiem lub bez cisPt (10 μ M). Wykresy przedstawiają wartości średnich arytmetycznych \pm SD z 5 niezależnych doświadczeń (A, B; n = 25) oraz 10 niezależnych eksperymentów (C; n = 50). Uzyskane wyniki przedstawiono jako % kontroli (żywołność komórek nietraktowanych przyjęto za 100%). * p<0,05 vs. kontrola (komórki nietraktowane); ## p<0,01 vs. kontrola z cisPt (komórki traktowane cisPt); ***/### p<0,001 w porównaniu do odpowiedniej kontroli.

10.3.1.2. Proliferacja komórek

Proliferację komórek linii K-562 po 24-godzinnej hodowli w obecności supernatantów KKCz oceniono wykorzystując metodę określającą ilość 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) wbudowanej do DNA w miejsce tymidyny dzielących się komórek. Zdolność do proliferacji komórek linii K-562 w obecności sNLR1, sLR1 oraz sLR42 była niższa (p<0,05) odpowiednio o ok. 25%, 30% i 25% w stosunku do kontroli nietraktowanej (Rycina 31). Komórki hodowane w obecności cisPt i supernatantów uzyskanych z niefiltrowanych jednostek KKCz, niezależnie od dnia otrzymania, charakteryzowały się obniżoną zdolnością do proliferacji (ponad 2-krotnie; p<0,01) względem komórek traktowanych cisPt. Komórki linii K-562 poddane działaniu cisPt

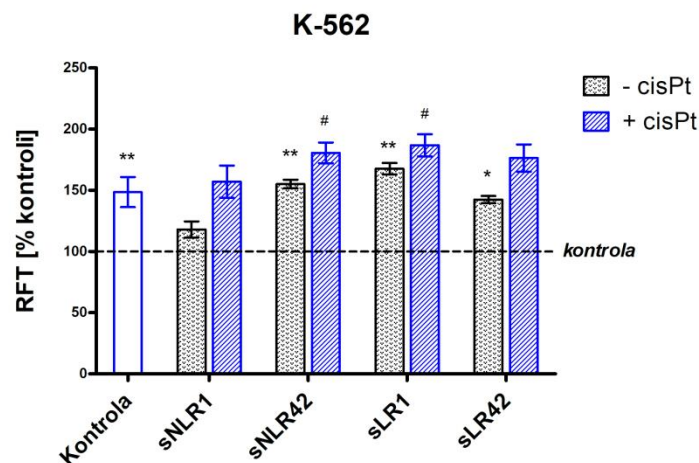
wykazywały spadek zdolność proliferacyjnych o ok. 50% ($p < 0,001$) w porównaniu do kontroli nietraktowanej, której wartość przyjęto za 100% (Rycina 31).



Rycina 31. Proliferacja komórek linii K-562 po 24-godzinnej inkubacji z supernatantami (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (10 μ M). Dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń (n = 15). Uzyskane wyniki wyrażono jako % kontroli (proliferyację komórek nietraktowanych przyjęto za 100%). * $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. odpowiednia kontrola.

10.3.1.3. Wewnątrzkomórkowy poziom RFT

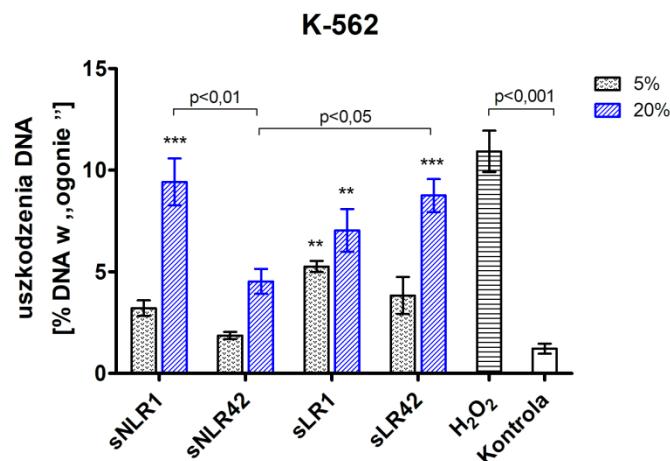
Poszukując przyczyny spadku przeżywalności i proliferacji komórek nowotworowych po 24-godzinnej hodowli w obecności supernatantów oceniono poziom generowanych wewnątrzkomórkowych RFT z użyciem sondy fluorescencyjnej $H_2DCF-DA$. Komórki linii K-562 po inkubacji z sNLR42, sLR1 oraz sLR42 wykazywały zwiększony poziom wewnątrzkomórkowych RFT odpowiednio o 55% ($p < 0,01$), 67% ($p < 0,01$) i 42% ($p < 0,05$) w porównaniu do komórek nietraktowanych (Rycina 32). W układzie badawczym, w którym komórki traktowano cisPt wzrost poziomu RFT zaobserwowano po inkubacji z sNLR42 (o ok. 31%; $p < 0,05$) i sLR1 (o ok. 38%; $p < 0,05$) względem kontroli (Rycina 32). Komórki badanej linii poddane działaniu samej cisPt wykazywały wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT o ok. 48% ($p < 0,01$) w porównaniu do kontroli (komórki nietraktowane lekiem przeciwnowotworowym) (Rycina 32).



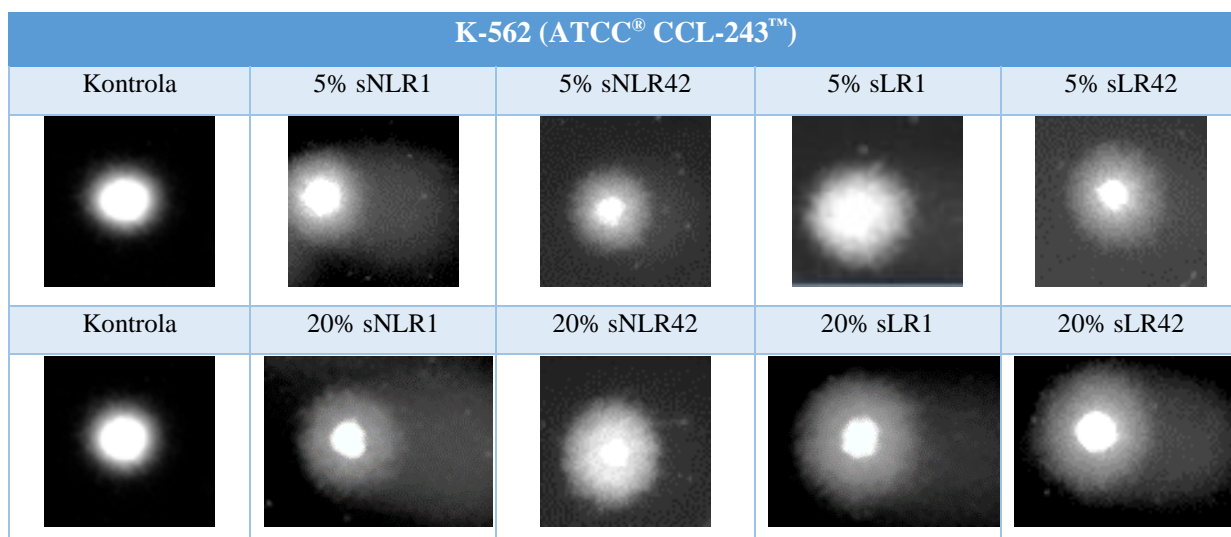
Rycina 32. Wewnątrzkomórkowy poziom RFT w komórkach linii K-562 po inkubacji (60 min., 37°C) z supernatantami KKCz (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (10 μ M). Dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SD z 5 niezależnych doświadczeń (n = 25). Uzyskane wyniki wyrażono jako % kontroli (poziom RFT w komórkach nietraktowanych przyjęto za 100%). */# p<0,05; ** p<0,01 w porównaniu z odpowiednią kontrolą.

10.3.1.4. Poziom uszkodzeń DNA

Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT może indukować uszkodzenia DNA dlatego kolejnym ocenianym parametrem był poziom uszkodzeń DNA (tj. jedno- i dwuniciowe pęknięcia oraz miejsca alkalicznie labilne) komórek linii K-562 po inkubacji z supernatantami KKCz określony testem kometowym w wersji alkalicznej. Doświadczenia na komórkach linii K-562 przeprowadzono w dwóch układach badawczych, w których inkubowano je z dodatkiem 5% oraz 20% supernatantu (Rycina 33). Uzyskane wyniki wykazały, że 5% sLR1 spowodował 6-krotny wzrost (p<0,01) ilości DNA „w ogonie” komety w porównaniu do kontroli. Zaś inkubacja komórek w obecności 20% sNLR1, sLR1 i sLR42 doprowadziła do wzrostu ilości uszkodzeń DNA odpowiednio ok. 8-krotnie (p<0,001), 6-krotnie (p<0,01) oraz 7-krotnie (p<0,001). Zaobserwowano jednocześnie, iż najmniej genotoksyczny wobec komórek K-562 okazał się supernatant jednostki niefiltrowanej po 42 dniach przechowywania (po inkubacji z 20% sNLR42 ok. 2-krotnie (p<0,01) mniejszy poziom uszkodzeń DNA w porównaniu z sNLR1, a także względem 20% sLR42 (p<0,05) (Rycina 33). Komórki badanej linii poddane działaniu 10 μ M H₂O₂ (kontrola pozytywna) charakteryzowały się wyższą ilością DNA „w ogonie” komety (ok. 10-krotny wzrost; p<0,001) w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Rycina 33). Rycina 34 przedstawia reprezentatywne zdjęcia komet DNA komórek badanej linii, wykonane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon model Eclipse E400 wyposażonego w kamerę ProgRes MF cool firmy Jenoptik.



Rycina 33. Uszkodzenia DNA, mierzone jako procentowa zawartość DNA w „ogonie”, w komórkach linii K-562 uprzednio inkubowanych (60 min., 37°C) z supernatantami KKCz (5%, 20%). Dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń (n = 15). ** p<0,01; *** p<0,001 vs. kontrola (komórki nietraktowane).



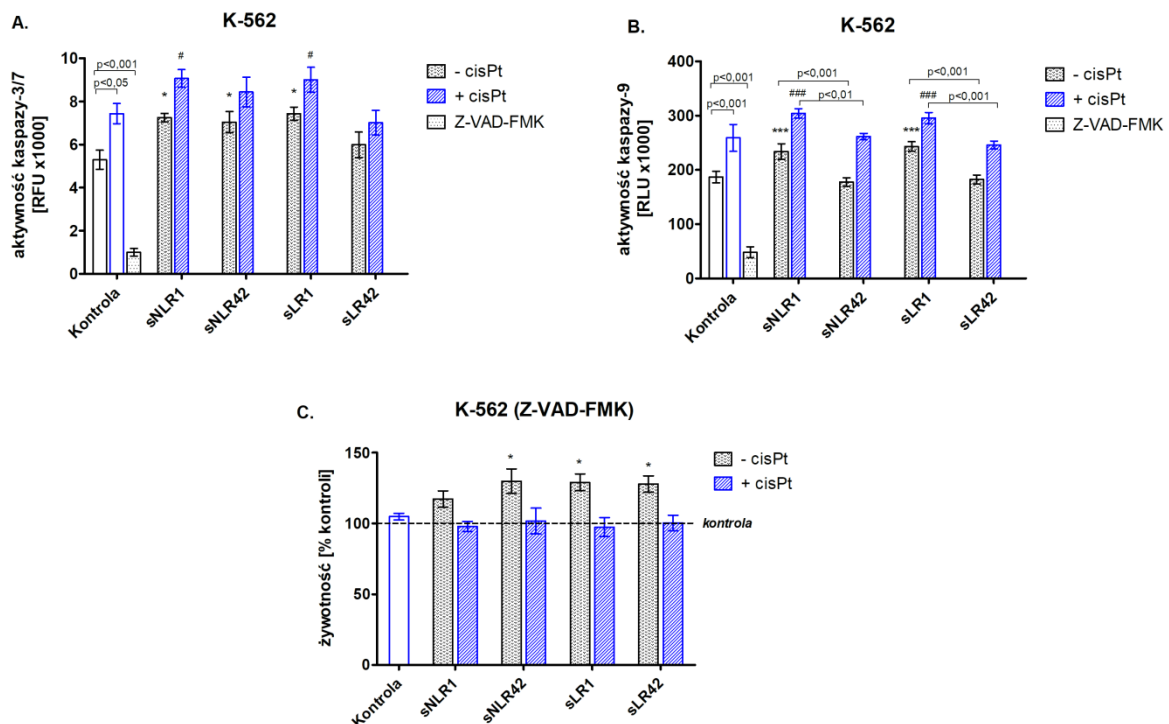
Rycina 34. Reprezentatywne zdjęcia komet DNA komórek linii K-562 poddanych działaniu supernatantów KKCz. Zdjęcia wykonano używając mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon model Eclipse E400 wyposażonego w kamerę ProgRes MF cool firmy Jenoptik (autorstwa K. Czubak-Prowizor).

10.3.1.5. Aktywność kaspazy-3/7 oraz kaspazy-9

W ostatnim etapie pracy dokonano oceny wpływu supernatantów z KKCz na proces apoptozy komórek nowotworowych poprzez pomiar aktywności enzymatycznej kaspazy-3/7 oraz kaspazy-9. Aktywność kaspazy-3/7 w komórkach linii K-562 traktowanych sNLR1, sNLR42 i sLR1 wzrastała o około 36% (p<0,05) względem kontroli (Rycina 35A). W obecności cisPt badane supernatanty, otrzymane z jednostek KKCz w 1. dniu przechowywania, również powodowały zwiększoną aktywność kaspazy-3/7 (o 22%; p<0,05) w porównaniu do komórek hodowanych z samą cisPt. Aktywność kaspazy-9 w komórkach linii K-562 traktowanych supernatantami uzyskanymi w 1. dniu przechowywania była znacznie

wyższa (sNLR1: o 25%; sLR1: o 30%; $p < 0,001$) w stosunku do kontroli (Rycina 35B). Podobne wyniki uzyskano w układzie badawczym z zastosowaniem cisPt - komórki hodowane w obecności sNLR1 i sLR1 wykazywały aktywność kaspazy-9 wyższą o około 20% ($p < 0,001$) względem kontroli. Na podstawie uzyskanych danych odnotowano mniejszą aktywność kaspazy-9 w komórkach traktowanych supernatantami uzyskanymi w 42. dniu przechowywania w porównaniu do 1. dnia, niezależnie od zastosowanego układu badawczego (Rycina 35B). Zastosowany lek przeciwnowotworowy znacząco aktywował kaspazę-3/7 (o ok. 48%; $p < 0,05$) oraz kaspazę-9 (o ok. 40%; $p < 0,001$), zaś inhibitor kaspaz Z-VAD-FMK hamował ich aktywność odpowiednio 5-krotnie i 4-krotnie ($p < 0,001$) (Rycina 35A i B).

Określono wpływ badanych supernatantów na przeżywalność komórek linii K-562 w obecności inhibitora aktywności kaspaz Z-VAD-FMK. Wyniki przedstawione na Rycinie 35C wskazują, iż komórki hodowane w obecności inhibitora oraz sNLR42, sLR1 i sLR42 charakteryzowały się wyższą o 30% ($p < 0,05$) przeżywalnością niż komórki nietraktowane.

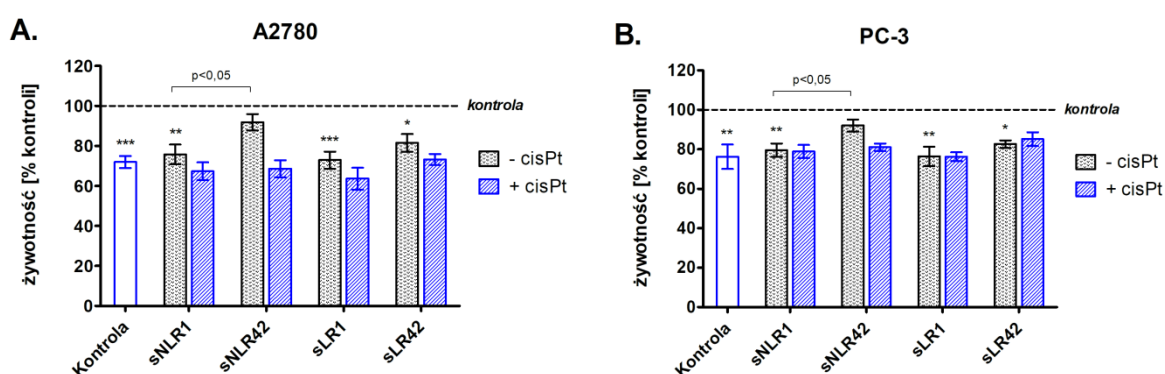


Rycina 35. Aktywność kaspazy-3/7 (A) i kaspazy-9 (B) w komórkach linii K-562 oraz przeżywalność komórek inkubowanych w obecności inhibitora kaspaz Z-VAD-FMK (C) traktowanych supernatantami pochodzącymi z KKCz (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (10 μ M). Dane uzyskane podczas pomiaru przeżywalności przedstawiono jako % kontroli (żywność komórek nietraktowanych przyjęto jako 100%). Wyniki z 3 niezależnych eksperymentów przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SD ($n = 15$). */# $p < 0,05$; ***/### $p < 0,001$ vs. odpowiednia kontrola.

10.3.2. Wybrane linie komórek nowotworowych wywodzących się z guzów litych

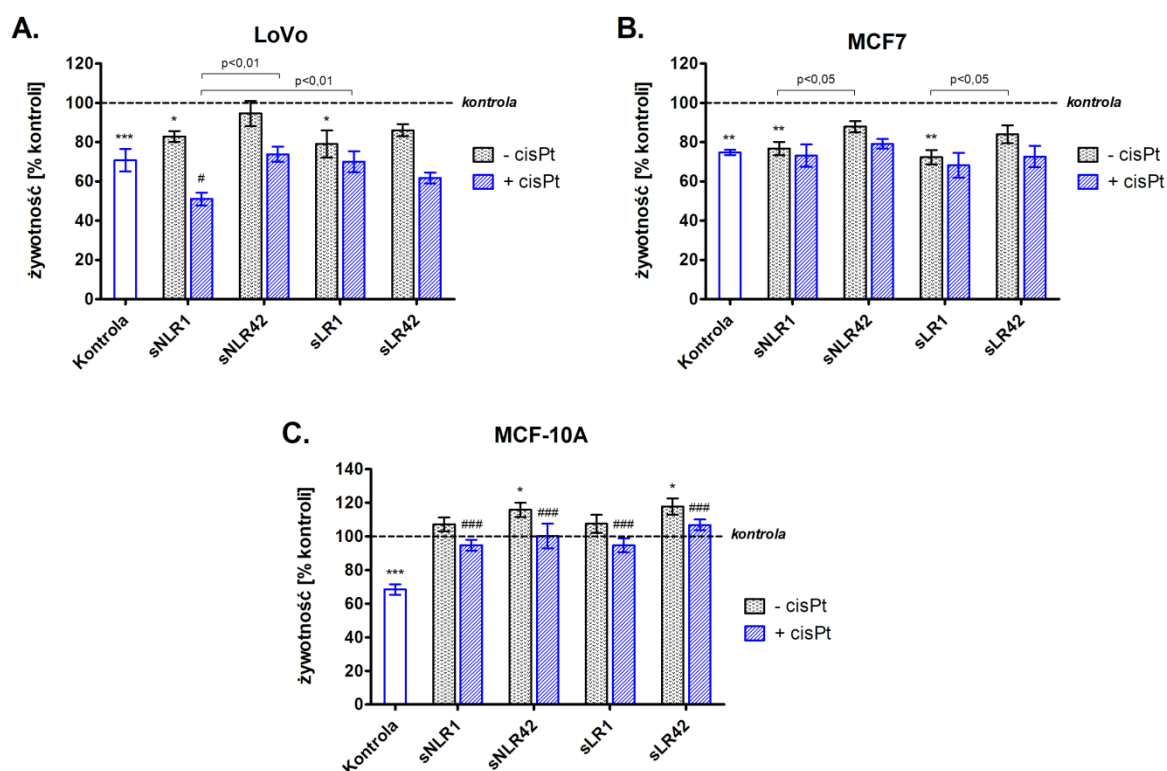
10.3.2.1. Przeżywalność komórek

Przeżywalność komórek wybranych ludzkich linii nowotworów tworzących guzy lite (A2780, PC-3, LoVo, MCF7) oraz odpowiedniej linii nienowotworowej (MCF-10A) oceniono po 24-godzinnej inkubacji z badanymi supernatantami KKCz, w ilości 5% na dołek, w obecności cisPt ($\frac{1}{2}$ IC₅₀) oraz w układzie bez leku przeciwnowotworowego (IC₅₀ wyznaczono wcześniej doświadczalnie dla każdej linii). Po 24-godzinnej hodowli komórek linii A2780 (endometrialny gruczolakorak jajnika) w obecności sNLR1, sLR1 oraz sLR42 wykazano znamienne statystycznie spadek przeżywalności komórek o odpowiednio 24% (p<0,01), 28% (p<0,001) i 18% (p<0,05) wobec kontroli negatywnej (Rycina 36A). Podobnie, zaobserwowano spadek żywotności (o ok. 20%) komórek linii PC-3 (komórki gruczolakoraka gruczołu krokowego) hodowanych w obecności tych trzech supernatantów (Rycina 36B). Zaobserwowano również większy odsetek żywych komórek obu linii hodowanych w obecności sNLR42 (o ok. 18% dla A2780 i 15% dla PC-3; p<0,05) względem sNLR1. W układzie badawczym z zastosowaniem leku przeciwnowotworowego nie wykazano istotnych statystycznie zmian w przeżywalności komórek w wyniku działania supernatantów pochodzących z KKCz (Rycina 36).



Rycina 36. Przeżywalność komórek linii A2780 (A) oraz PC-3 (B) po 24-godzinnej inkubacji z supernatantami (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (odpowiednio 5 oraz 10 μ M). Wykres przedstawia wartości średnich arytmetycznych \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń (n = 15). Uzyskane wyniki przedstawiono jako % kontroli (żywotność komórek nietraktowanych przyjęto za 100%). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs. kontrola (komórki nietraktowane).

W następnej kolejności badano wpływ supernatantów na komórki gruczolakoraka jelita grubego (LoVo). Wyniki przedstawione na Rycinie 37A wskazują na zmniejszoną przeżywalność komórek w obecności supernatantów KKCz otrzymanych w 1. dniu przechowywania, zarówno pochodzących z jednostek poddanych leukoredukcji, jak i niefiltrowanych (o ok. 20%; $p < 0,05$) w stosunku do kontroli. W układzie badawczym z zastosowaniem cisPt zaobserwowano spadek żywotności komórek LoVo o 20% ($p < 0,05$) po 24-godzinach hodowli z sNLR1 w porównaniu do komórek traktowanych samą cisPt; a ponadto wykazano także istotnie wyższy odsetek żywych komórek (o ok. 22%; $p < 0,01$) w obecności sNLR42 oraz sLR1 względem sNLR1.



Rycina 37. Przeżywalność komórek linii LoVo (A), MCF7 (B) oraz MCF-10A (C) po 24-godzinnej inkubacji z supernatantami (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (odpowiednio 25, 25 oraz 40 μM). Wykres przedstawia wartości średnich arytmetycznych \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń ($n = 15$). Uzyskane wyniki przedstawiono jako % kontroli (żywotność komórek nietraktowanych przyjęto za 100%). */# $p < 0,05$; ***/### $p < 0,001$ w porównaniu do odpowiedniej kontroli; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. kontrola (komórki nietraktowane).

Badania przeprowadzone na komórkach estrogenozależnego gruczolakoraka gruczołu piersiowego (MCF7) potwierdziły zaobserwowany w eksperymentach na pozostałych liniach komórek spadek żywotności po zastosowaniu sNLR1 (o ok. 24%; $p < 0,01$) oraz sLR1 (o ok. 28%; $p < 0,01$) względem kontroli (Rycina 37B). Uzyskane wyniki wskazują, iż niezależnie od sposobu przygotowania jednostki KKCz, w 1. dniu przechowywania

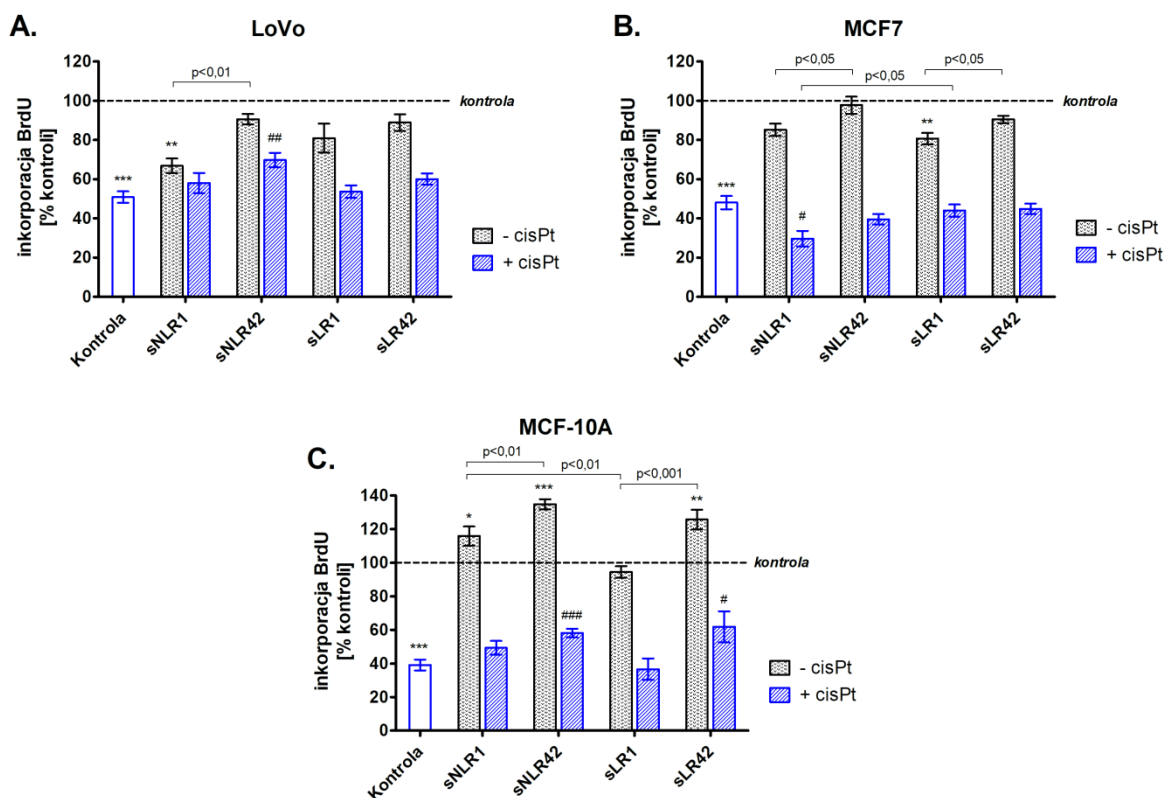
odnotowano niższą (o ok. 12%; $p < 0,05$) przeżywalność komórek nowotworowych w stosunku do komórek po inkubacji z supernatantami uzyskanymi w 42. dniu przechowywania.

Dla porównania w badaniach wykorzystano również nienowotworowe komórki nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A). Komórki linii nienowotworowej hodowane w obecności sNLR42 oraz sLR42 charakteryzowały się znamienne wyższą (o ok. 17%; $p < 0,05$) przeżywalnością w porównaniu do kontrolnych (Rycina 37C). Wykazano, iż żywotność komórek MCF-10A hodowanych z cisPt oraz supernatantami była wyższa o ponad 32% ($p < 0,001$) względem komórek traktowanych tylko cisPt.

Wykazano spadek żywotności komórek wszystkich badanych linii po działaniu cisPt - do ok. 70% ($p < 0,001$) w przypadku linii A2780, LoVo i MCF-10A oraz do ok. 75% ($p < 0,01$) dla linii PC-3 i MCF7 w porównaniu do kontroli negatywnej (Rycina 36 i 37).

10.3.2.2. Proliferacja komórek

Supernatanty sNLR1 i sLR1 znacząco zmniejszały proliferację odpowiednio komórek LoVo (o ok. 33%; $p < 0,01$) i MCF7 (o ok. 20%; $p < 0,01$) w stosunku do kontroli (Rycina 38A i B). Natomiast komórki nienowotworowe MCF-10A hodowane przez 24 godziny w obecności sNLR1, sNLR42 i sLR42 wykazywały większą zdolność proliferacji niż komórki nietraktowane (odpowiednio o 15% ($p < 0,05$), 35% ($p < 0,001$) i 25% ($p < 0,01$) – Rycina 38C). W układzie z cisPt komórki LoVo inkubowane z sNLR42 wykazywały wzrost zdolności do proliferacji (o 20%; $p < 0,01$), a inkubacja komórek MCF7 z sLR1 powodowała zmniejszenie ich zdolności proliferacyjnych (o 20%; $p < 0,05$), względem komórek kontrolnych (inkubowanych tylko z cisPt). Natomiast inkubacja z supernatantami z 42. dnia skutkowała wzrostem proliferacji komórek MCF-10A, o odpowiednio 19% (jednostki niefiltrowane; $p < 0,001$) oraz 22% (jednostki filtrowane; $p < 0,05$). Wszystkie trzy linie komórkowe wykorzystane w badaniach były wrażliwe na działanie cisPt - w obecności tego leku przeciwnowotworowego zaobserwowano spadek zdolności proliferacyjnych do poziomu ok. 50% ($p < 0,001$) w przypadku linii LoVo i MCF7 oraz do ok. 40% ($p < 0,001$) dla linii MCF-10A w porównaniu do komórek nietraktowanych, których ilość wbudowanej BrdU przyjęto za 100% (Rycina 38).

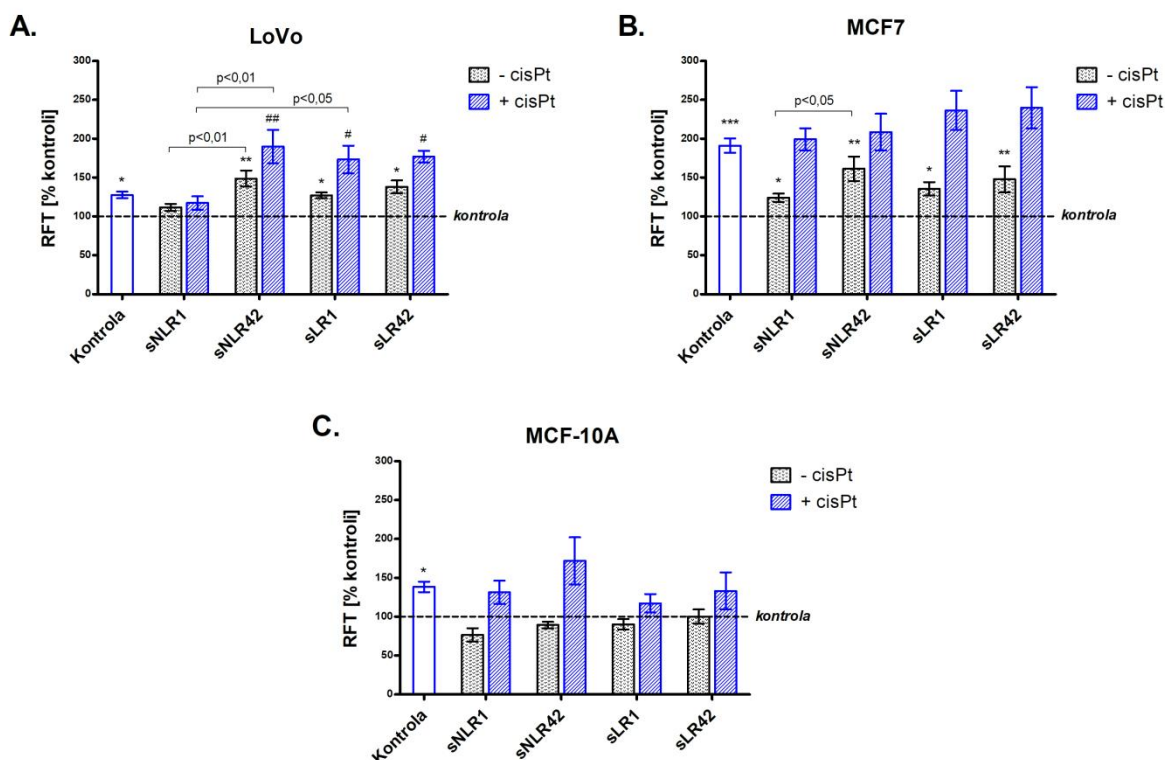


Rycina 38. Proliferacja komórek linii LoVo (A), MCF7 (B) oraz MCF-10A (C) po 24-godzinnej inkubacji z supernatantami (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (cisPt; A, B: 25 μ M; C: 40 μ M). Dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń (n = 15). Uzyskane wyniki wyrażono jako % kontroli (proliferaację komórek nietraktowanych przyjęto za 100%). */# p<0,05; **/### p<0,01; ***/#### p<0,001 vs. odpowiednia kontrola.

10.3.2.3. Wewnątrzkomórkowy poziom RFT

Komórki linii LoVo (gruczolakoraka jelita grubego) inkubowane w obecności sNLR42, sLR1 i sLR42 charakteryzowały się zwiększonym poziomem wewnątrzkomórkowych RFT w porównaniu do kontroli (sNLR42 o ok. 48% (p<0,01), sLR1 o ok. 30% (p<0,05), sLR42 o ok. 38% (p<0,05) (Rycina 39A). Odnotowano, że komórki linii LoVo inkubowane z sNLR42, sLR1 oraz sLR42 i dodatkowo z cisPt także charakteryzowały się zwiększonym poziomem RFT, w porównaniu z komórkami inkubowanymi z samą cisPt (sNLR o ok. 62% (p<0,01), a sLR o ok. 45% (p<0,05)) (Rycina 39A). Wyniki przedstawione na Rycinie 39B wskazują, że wszystkie badane supernatanty KKCz powodują wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT w komórkach linii MCF7 (sNLR1 o 24% (p<0,05), sNLR42 o 61% (p<0,01), sLR1 o 35% (p<0,05), sLR42 o 47% (p<0,01)) względem komórek nietraktowanych. Wykazano, iż badane supernatanty nie wpływają na poziom RFT komórek nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A; Rycina 39C). W komórkach badanych linii poddanych działaniu cisPt wykazano

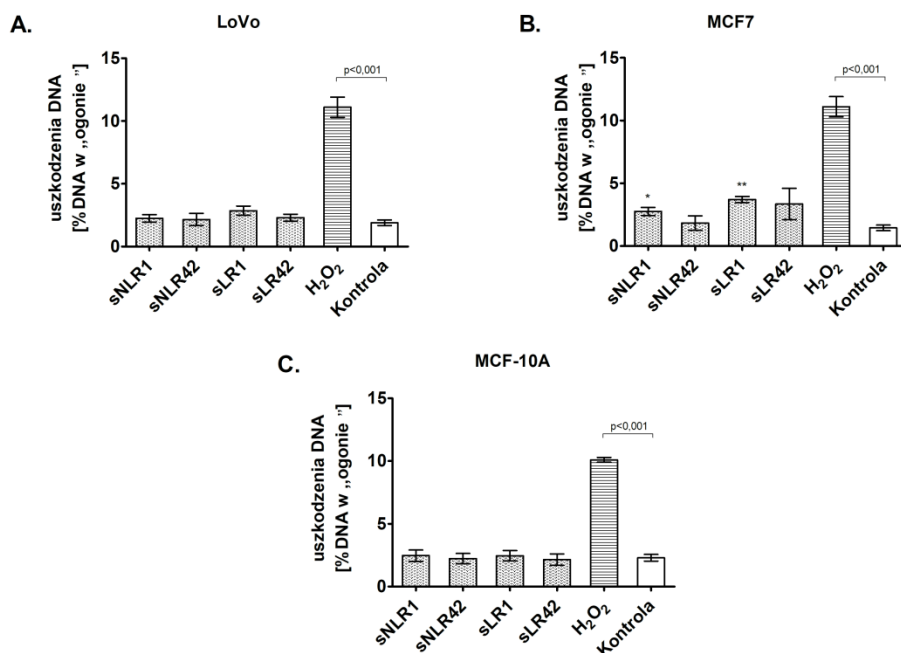
istotny wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu RFT, o ok. 90% ($p < 0,001$) w przypadku linii MCF7 oraz o ponad. 30% ($p < 0,05$) dla linii LoVo i MCF-10A, w porównaniu do komórek kontrolnych nietraktowanych lekiem przeciwnowotworowym (Rycina 39).



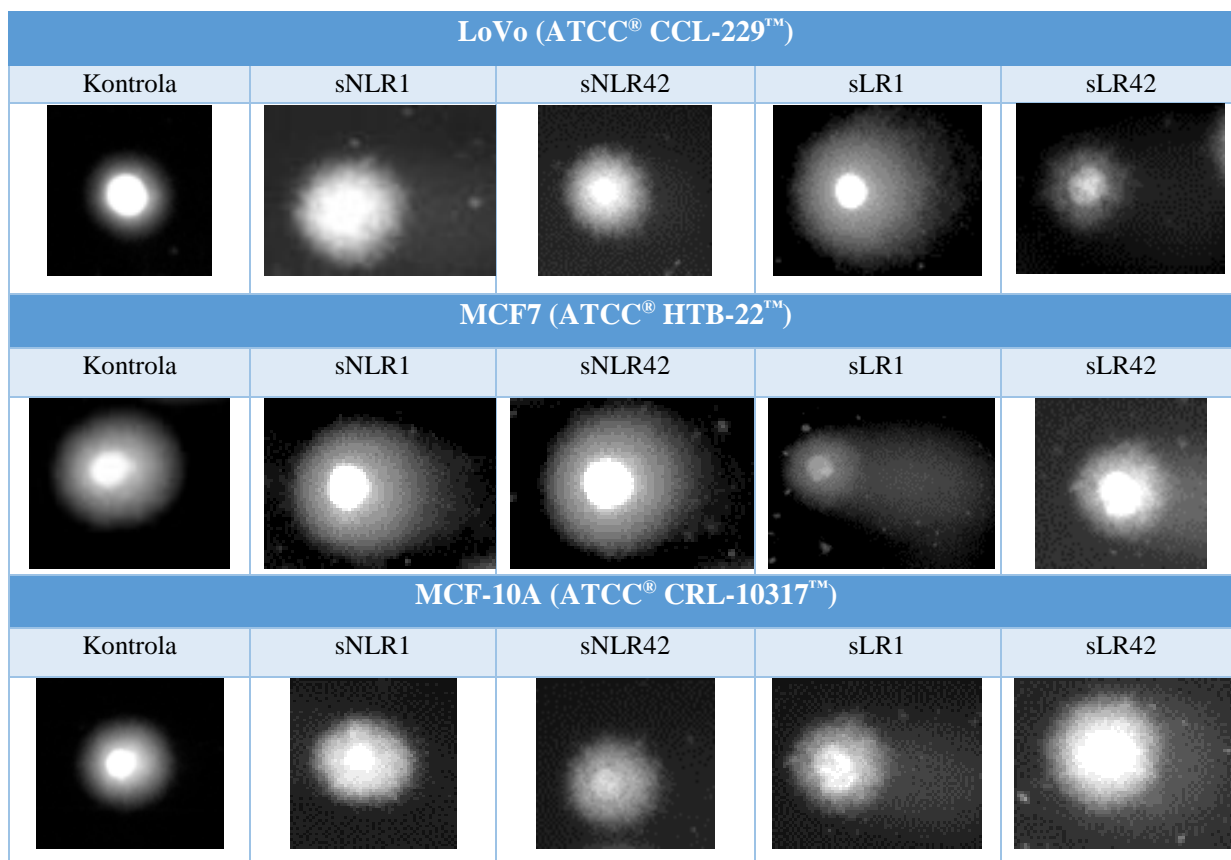
Rycina 39. Wewnątrzkomórkowy poziom RFT w komórkach linii LoVo (A), MCF7 (B) oraz MCF-10A (C) po inkubacji (60 min., 37°C) z supernatantami KKCz (5%) z dodatkiem lub bez cisPt (cisPt; A, B: 25 μ M; C: 40 μ M). Dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SD z 5 niezależnych doświadczeń ($n = 25$). Uzyskane wyniki wyrażono jako % kontroli (poziom RFT w komórkach nietraktowanych przyjęto za 100%). */# $p < 0,05$; **/## $p < 0,01$ w porównaniu z odpowiednią kontrolą; *** $p < 0,001$ vs. kontrola (komórki nietraktowane).

10.3.2.4. Poziom uszkodzeń DNA

Wykazano, że poziom uszkodzeń DNA komórek linii MCF7 wzrósł znamienne statystycznie po inkubacji z sNLR1 (o ok. 90%; $p < 0,05$) oraz sLR1 (2-krotnie; $p < 0,01$) względem kontroli negatywnej (Rycina 40B), chociaż zaobserwowany poziom uszkodzeń DNA był bardzo niski (poniżej 5% DNA w „ogonie”). Supernatanty KKCz nie wpływały na poziom uszkodzeń DNA komórek linii LoVo (Rycina 40A) ani komórek nienowotworowych MCF-10A (Rycina 40C). Rycina 41 przedstawia reprezentatywne zdjęcia komet DNA komórek badanych linii wykonane przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon model Eclipse E400 wyposażonego w kamerę ProgRes MF cool firmy Jenoptik.



Rycina 40. Uszkodzenia DNA, mierzone jako procentowa zawartość DNA w „ogonie”, w komórkach linii LoVo (A), MCF7 (B) oraz MCF-10A (C) uprzednio inkubowanych (60 min., 37°C) z supernatantami pochodzącymi z KKCz (5%). Dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń (n = 15). * p<0,05; ** p<0,01 vs. kontrola (komórki nietraktowane).

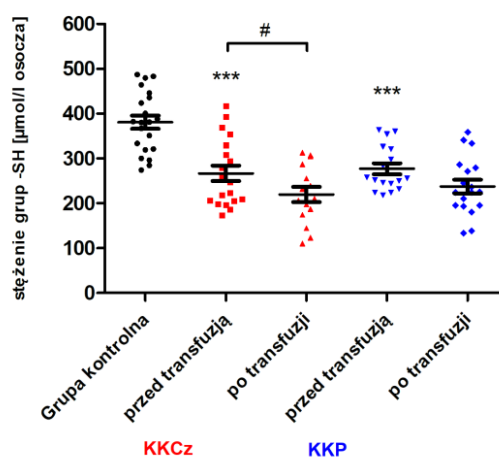


Rycina 41. Reprezentatywne zdjęcia komet DNA komórek linii LoVo, MCF7 oraz MCF-10A poddanych działaniu supernatantów pochodzących z KKCz. Zdjęcia wykonano używając mikroskopu fluorescencyjnego firmy Nikon model Eclipse E400 wyposażonego w kamerę ProgRes MF cool firmy Jenoptik (autorstwa K. Czubak-Prowizor).

10.4. Ocena wybranych markerów stresu oksydacyjnego po przetoczeniu KKCz lub KKP w osoczu krwi chorych z AML

10.4.1. Stężenie grup tiolowych

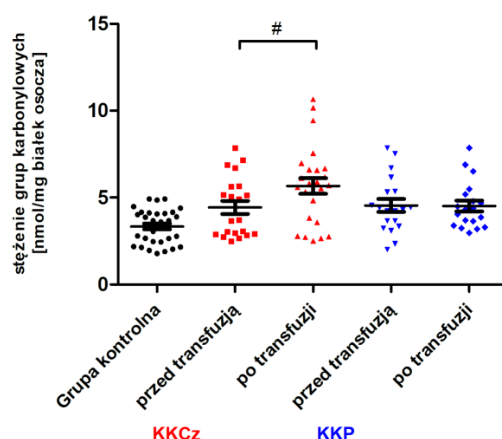
Celem przeprowadzonych doświadczeń była ocena poziomu uszkodzeń oksydacyjnych/nitracyjnych białek osocza poprzez pomiar stężenia grup tiolowych (-SH) i karbonylowych (-CO) oraz poziomu 3-nitrotyrozyny (3-NT). Za pomocą metody Ellman'a określono zawartość grup tiolowych (-SH) w osoczu pacjentów z AML, przed i 24 godz. po przetoczeniu składnika krwi oraz grupy kontrolnej składającej się ze zdrowych ochotników (Rycina 42). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazano, iż stężenie grup -SH w grupie chorych (przed przetoczeniem) jest niższe o około 30% ($p < 0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej, co może być spowodowane utlenieniem tych grup (wzrost poziomu stresu oksydacyjnego). Po przetoczeniu KKCz obserwowano istotny statystycznie spadek (o 18%; $p < 0,05$) stężenia grup -SH, w porównaniu z wartością przed transfuzją.



Rycina 42. Stężenie grup tiolowych [$\mu\text{mol/l}$ osocza] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. # $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 30$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.2. Zawartość grup karbonylowych

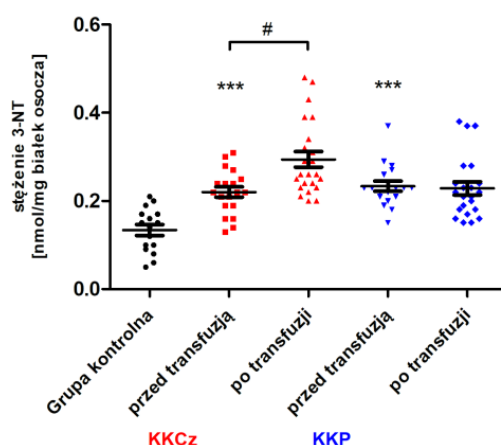
Następnie dokonano oceny zawartości grup karbonylowych w białkach osocza. Wykazano znamienne statystycznie wzrost, o ok. 30% ($p < 0,05$), stężenia grup -CO u pacjentów z AML 24 godz. po transfuzji KKCz w porównaniu do poziomu przed przetoczeniem (Rycina 43). W porównaniu z grupą kontrolną, u chorych nie zaobserwowano istotnie podwyższonego poziomu tego markera stresu oksydacyjnego.



Rycina 43. Stężenie grup karbonylowych [nmol/mg białek osocza] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. # $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 33$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.3. Poziom 3-nitrotyrozyny

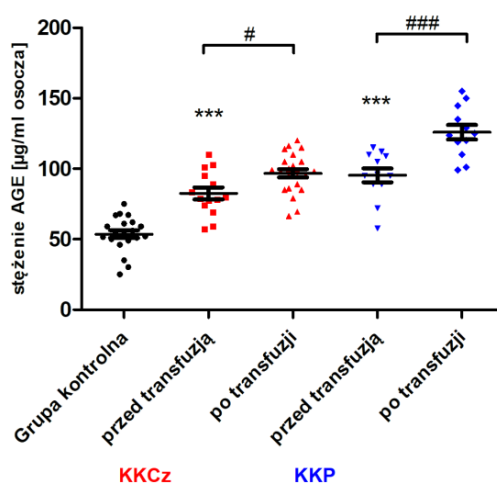
W kolejnym etapie badań przeprowadzono oznaczenie poziomu 3-nitrotyrozyny w białkach osocza pacjentów chorych na AML oraz w grupie kontrolnej (Rycina 44). W osoczu chorych zaobserwowano ok. 64%. ($p < 0,001$) wzrost stężenia 3-NT w porównaniu do zdrowych ochotników. Dobę po przetoczeniu KKCz poziom 3-NT w grupie chorych był istotnie wyższy (o ok. 35%) niż przed transfuzją. W grupie chorych po podaniu KKP nie obserwowano zmian poziomu badanego parametru.



Rycina 44. Stężenie 3-NT [nmol/mg białek osocza] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. # $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 25$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.4. Zawartość końcowych produktów zaawansowanej glikacji

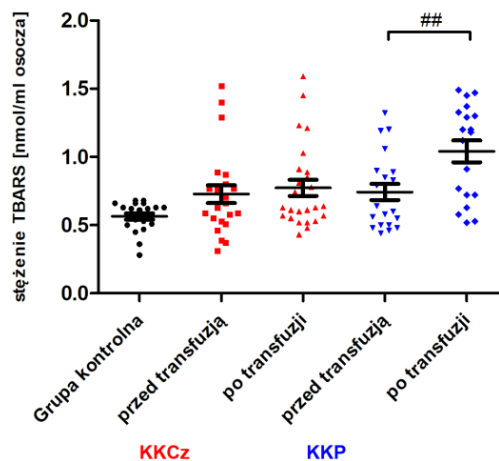
Następnym oznaczonym markerem stresu oksydacyjnego były końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGE), które powstają w wyniku reakcji pomiędzy grupą karbonylową cukrów redukujących, a wolną grupą aminową białek, fosfolipidów i kwasów nukleinowych [217]. Na podstawie uzyskanych wyników, wykazano znaczny wzrost zawartości AGE w osoczu osób z AML w stosunku do grupy kontrolnej, odpowiednio o ok. 54% u pacjentów wymagających przetoczenia KKCz ($p < 0,001$) i o ok. 78% przed transfuzją KKP ($p < 0,001$) (Rycina 45). Co ciekawe, zaobserwowano również wzrost stężenia AGE u chorych 24 godz. po podaniu KKCz (ok. 23%; $p < 0,05$) oraz KKP (ok. 31%; $p < 0,001$).



Rycina 45. Stężenie końcowych produktów zaawansowanej glikacji (AGE) [$\mu\text{g/ml}$ osocza] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. # $p < 0,05$; ***/### $p < 0,001$; $n = 30$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.5. Peroksydacja lipidów

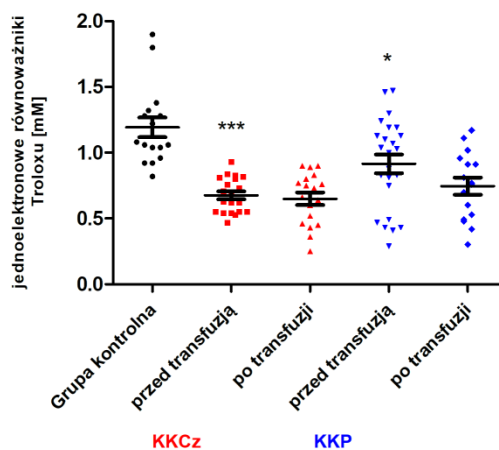
Stopień peroksydacji lipidów osocza u chorych na AML przed i po przetoczeniu składników krwi oceniono wykorzystując metodę opierającą się na pomiarze stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) (Rycina 46). U chorych 24 godz. po podaniu KKP wykazano wzrost poziomu TBARS (o 45%; $p < 0,01$) względem wartości przed przetoczeniem. Wyniki przedstawione na Rycinie 46 ilustrują jedynie tendencję wzrostową badanego parametru u chorych (przed transfuzją) w porównaniu do grupy kontrolnej.



Rycina 46. Stężenie TBARS [nmol/ml osocza] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 31$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.6. Całkowity potencjał antyoksydacyjny

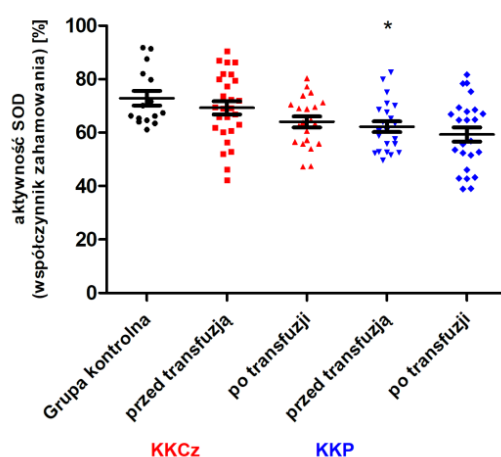
Oznaczanie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza, na podstawie metody opracowanej przez Erel'a i wsp. wykazało, iż poziom CPA u chorych z AML jest znacząco niższy względem grupy kontrolnej, o ok. 45% ($p < 0,001$) w grupie u pacjentów wymagających podania KKCz oraz o ok. 25% ($p < 0,05$) w grupie pacjentów, którym zlecono przetoczenie KKP (Rycina 47). Jednocześnie zaobserwowano, iż podanie badanych składników krwi nie wpływa istotnie na poziom CPA osocza chorych po dobie od transfuzji.



Rycina 47. Całkowity potencjał antyoksydacyjny (CPA) osocza [mM jednoelektronowych równoważników Troloxu] pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. */# $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 25$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.7. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej

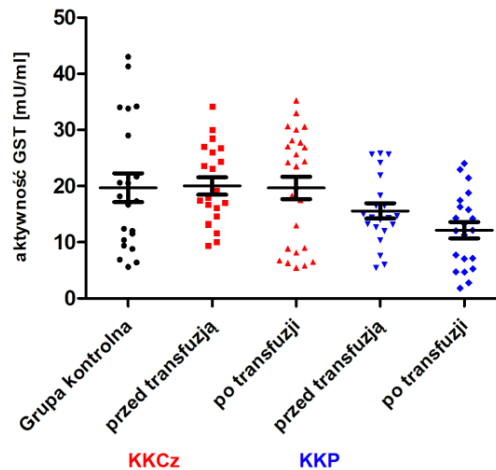
W związku z zaobserwowanym znacznym spadkiem całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza chorych z AML przeprowadzono pomiar aktywności dwóch wybranych enzymów antyoksydacyjnych, tj. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) oraz transferaza glutationowa (GST). Wyniki przedstawione na Rycinie 48 wskazują na spadek aktywności SOD o ok. 15% ($p < 0,05$) w osoczu chorych wymagających transfuzji KKP w stosunku do aktywności enzymu u zdrowych ochotników. Niezależnie od typu podanego składnika krwi nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie aktywności SOD w osoczu chorych po 24 godzinach od przetoczenia.



Rycina 48. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [współczynnik zahamowania; %] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 25$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.8. Aktywność transferazy glutationowej

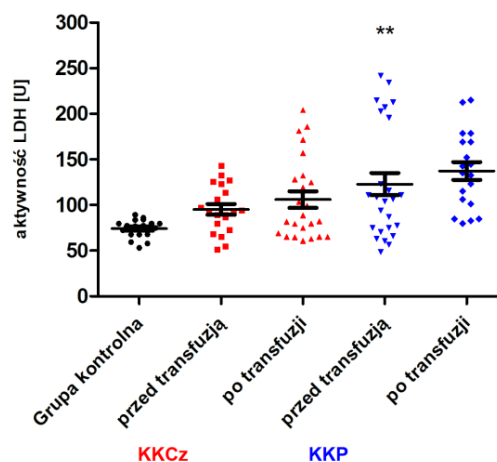
W porównaniu z grupą kontrolną, u chorych z AML nie zaobserwowano zmian w aktywności transferazy glutationowej (GST) (Rycina 49). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów nie wykazano również zmian poziomu badanego parametru u chorych po 24 godz. po podaniu składników krwi.



Rycina 49. Aktywność transferazy glutationowej (GST) [mU/ml] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. # $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 29$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.4.9. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej

Ostatnim parametrem oznaczanym w obrębie tego zadania badawczego była aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w osoczu - markera uszkodzenia komórek, które może nastąpić wskutek zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu. Uzyskane wyniki wskazują na wzmożoną aktywność LDH w osoczu osób z AML (wzrost o 65%; $p < 0,01$) wymagających przetoczenia KKP, w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 50). Niezależnie od typu podanego składnika krwi w osoczu chorych po 24 godzinach nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie aktywności LDH.



Rycina 50. Zewnątrzkomórkowa aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) [U] u pacjentów z AML (przed i po przetoczeniu składników krwi) oraz w grupie kontrolnej. Dane przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 25$ (grupa kontrolna); $n = 27$ (KKCz); $n = 25$ (KKP).

10.5. Retrospektywna analiza niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaistniałych w WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w latach 2013-2016

Przetaczanie składników krwi, czy produktów krwiopochodnych jest zabiegiem medycznym niejednokrotnie ratującym życie pacjentów, jednak zawsze niesie ze sobą ryzyko wystąpienia reakcji poprzetoczeniowych u biorcy. Ryzyko związane z leczeniem składnikami krwi jest trudne do określenia, ponieważ zależy od wielu czynników, dlatego też ten rodzaj terapii powinien być stosowany jedynie w przypadkach uzasadnionych i koniecznych. Celem pracy była retrospektywna analiza niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaistniałych w WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w okresie od 01.01.2013 roku do 27.04.2016 roku. Materiał do badań stanowiły formularze zgłoszenia odczynu poprzetoczeniowego wypełnione przez lekarza zlecającego transfuzję oraz protokoły opracowania odczynu na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych w RCKiK w Łodzi. Niniejsza praca powstała we współpracy z Pracownią Serologii Transfuzjologicznej WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi.

10.5.1. Charakterystyka niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych

Dokonano analizy wszystkich 70. zgłoszeń niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych, które wystąpiły w oddziałach WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej.

Tabela 11. Liczba przetoczonych jednostek składników krwi w oddziałach WWCOiT im. M. Kopernika w latach 2013-2016* wraz z ilością zaistniałych odczynów i współczynnikiem liczby reakcji niepożądanych

Składnik krwi		2013	2014	2015	2016*	Suma
Koncentrat krwinek czerwonych (KKCz)	jednostki	10 220	9 626	9 846	3 205	32 897
	odczyny (#)	13 (1,27)	8 (0,83)	10 (1,02)	1 (0,31)	
Koncentrat krwinek płytkowych (KKP)	jednostki	4 188	4 060	3 860	1 210	13 318
	odczyny (#)	5 (1,19)	5 (1,23)	3 (0,78)	7 (5,79)	
Świeżo mrożone osocze (FFP)	jednostki	3 779	2 989	2 846	934	10 548
	odczyny (#)	6 (1,59)	4 (1,34)	7 (2,46)	1 (1,07)	
Ogółem		18 187	16 675	16 552	5 349	56 763
Liczba odczynów		24	17	20	9	70
Współczynnik [#]		1,32	1,02	1,21	1,68	1,23

*włącznie do dnia 27.04.2016; [#]współczynnik liczby odczynów potransfuzyjnych na 1 000 przetoczonych jednostek

Dane przedstawione w Tabeli 11 wskazują, iż liczba przetoczonych jednostek poszczególnych składników krwi utrzymuje się na zbliżonym poziomie w okresie od 01.01.2013 roku do 27.04.2016 roku. Przetoczono niemal 3-krotnie więcej jednostek KKCz (32 897) w porównaniu do jednostek KKP i FFP, których ilość nie różniła się tak znacznie, odpowiednio 13 318 i 10 548. Wartość współczynnika określającego liczbę odczynów na 1 000 przetoczonych jednostek składników krwi utrzymywała się w zakresie od 1,02 do 1,68. Znaczną zmienność wartości współczynnika zaobserwowano w przypadku KKP i FFP po 2014 roku, w obu przypadkach współczynnik wzrósł w 2016 roku w stosunku do roku poprzedniego.

Tabela 12. Dane demograficzne pacjentów WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi, u których wystąpiły niepożądane reakcje poprzetoczeniowe w latach 2013-2016 wraz z poziomem przyczynowości, ilością zaistniałych odczynów poprzetoczeniowych i współczynnikiem liczby reakcji niepożądanych

Składnik krwi	Wiek [mediana i zakres]	Płeć [♀/♂]	Ocena związku z transfuzją (poziom przyczynowości)*	Liczba odczynów	Współczynnik [#]
KKCz	63 (41 – 88)	18/14 ⁺	1. – 13 2. – 16 3. – 3	32	0,97
KKP	36 (18 – 91)	10 ⁺ /10	1. – 3 2. – 13 3. – 4	20	1,50
FFP	63 (31 – 87)	8 ⁺ /10 ⁺	0. – 1 1. – 3 2. – 13 3. – 1	18	1,71

*0. wykluczona, mało prawdopodobna; 1. możliwa; 2. prawdopodobna; 3. pewna, udowodniona; ⁺1 przypadek zakończony zgonem; [#]współczynnik liczby odczynów potransfuzyjnych na 1 000 przetoczonych jednostek

Udokumentowane odczyny podzielono względem rodzaju przetoczonego składnika krwi (KKCz, KKP, FFP), po którym wystąpiła niekorzystana reakcja u biorcy (Tabela 12-Tabela 15). Wśród badanej grupy 70. chorych znajdowało się 36 kobiet oraz 34 mężczyzn w wieku od 18 do 91 lat (Tabela 12). Niemal połowę zaobserwowanych odczynów stanowili pacjenci po przetoczeniu KKCz, aż 32 przypadki (18 kobiet i 14 mężczyzn). Liczba reakcji poprzetoczeniowych, która wystąpiła po podaniu KKP i FFP w badanej grupie była zbliżona, odpowiednio 20 (10 kobiet i 10 mężczyzn) i 18 (8 kobiet i 10 mężczyzn) przypadków. Mediana wieku w grupie chorych z odczynami po przetoczeniu KKCz i FFP wynosiła 63 lata, a zakres odpowiednio od 41 do 88 lat i od 31 do 87 lat. Natomiast wiek pacjentów, którym przetoczono KKP i zaobserwowano występowanie odczynu wynosił zaledwie 36 lat (zakres od 18 do 91 lat). Większość zaistniałych przypadków we wszystkich trzech grupach oceniono jako posiadające prawdopodobny (2.) poziom przyczynowości.

U jednego chorego po transfuzji FFP wykluczono związek z przetoczeniem zaistniałego odczynu. Niepożądane reakcje poprzetoczeniowe o poziomie przyczynowości określonym jako pewne, udowodnione stanowiły maksymalnie do 20% wszystkich przypadków (odczyn po KKP, ok. 10% po KKCz oraz ok. 5% po FFP). Trzech chorych (w tym kobieta i dwóch mężczyzn) zmarło prawdopodobnie w wyniku przebiegu choroby podstawowej, jednak nie wykluczono wpływu przetoczenia na śmierć pacjentów (poziom przyczynowości oceniono jako możliwy). W przypadku pacjentki, która zmarła po podaniu FFP wykluczono związek z przetaczanym składnikiem krwi. Jednoznaczne dowody wskazały, że śmierć 82-letniej chorej nastąpiła w wyniku rozległego udaru krwotocznego mózgu. Najniższy współczynnik liczby odczynów na 1 000 przetoczonych jednostek zaobserwowano w grupie pacjentów leczonych KKCz, następnie KKP i na końcu FFP (Tabela 12).

Tabela 13. Rodzaje składników krwi, po przetoczeniu których wystąpiły niepożądane reakcje poprzetoczeniowe u biorców

Składnik krwi	Rodzaj składnika krwi
KKCz	KKCz bez kożuszka leukocyarno-płytkowego – 26
	Napromieniowany Ubogoleukocytny KKCz (NUKKCz) – 5
	Ubogoleukocytny KKCz (UKKCz) – 1
KKP	Zlewany Napromieniowany Ubogoleukocytny KKP (Zl. NUKKP) – 12
	Napromieniowany Ubogoleukocytny KKP z aferezy (NUKKP-Af.) – 5
	Zlewany KKP (Zl. KKP) – 2
	Ubogoleukocytny KKP z aferezy po inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych (UKKP-Af. inakt.) – 1
FFP	Osocze Świeżo Mrożone (FFP) – 18

Koncentratem krwinek czerwonych, po którym najczęściej występowały odczyny poprzetoczeniowe był KKCz bez kożuszka leukocyarno-płytkowego (26 z 32 przypadków). W grupie pacjentów, którym podano KKP niepożądane reakcje poprzetoczeniowe najczęściej obserwowano po transfuzji zlewane go napromienianego ubogoleukocytnego KKP (12 z 20 przypadków) (Tabela 13).

Ponad 45% zaistniałych niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaklasyfikowano jako niehemolityczne odczyny gorączkowe, które w głównej mierze występowały po podaniu KKCz (20 przypadków), następnie po KKP (7), FFP (4) oraz jeden raz po przetoczeniu wieloskładnikowym (KKCz i FFP) (Tabela 14). Drugim w kolejności, co do częstości występowania odczynem poprzetoczeniowym (ok. 31,5%) była reakcja alergiczna, którą zaobserwowano przede wszystkim po podaniu KKP (12 przypadków) i FFP (8), po KKCz

i KKCz z FFP tylko po jednym przypadku. Opisane powyżej odczyny określane są mianem lekkich reakcji poprzetoczeniowych. U ok. 8,5% chorych (sześć przypadków, w tym cztery po podaniu KKP i dwa po KKCz) wystąpiła alloimmunizacja poprzetoczeniowa, zaś poprzetoczeniowe przeciążenie układu krążenia obserwowano u ok. 5,7% biorców (cztery przypadki, w tym trzy po KKCz i jeden po FFP). Najrzadziej występującymi niepożądanymi reakcjami poprzetoczeniowymi u pacjentów WWCOiT im. M. Kopernika był wstrząs anafilaktyczny oraz ostra reakcja hemolityczna (po jednym przypadku po przetoczeniu FFP) i ostre uszkodzenie płuc oraz reakcja hipotensyjna (po jednym przypadku po przetoczeniu KKCz). Po transfuzji wieloskładnikowej (KKCz i FFP), w jednym przypadku składnikiem krwi odpowiedzialnym za powikłanie uznano KKCz (niehemolityczna reakcja gorączkowa), zaś w drugim FFP (reakcja alergiczna).

Tabela 14. Klasyfikacja niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych u pacjentów WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w latach 2013-2016

Rodzaj reakcji	KKCz (♀/♂)	KKP (♀/♂)	FFP (♀/♂)	KKCz+FFP (♀/♂)	Ogółem	Ryzyko wystąpienia
niehemolityczna reakcja gorączkowa	20 (10/10)	7 (5/2)	4 (2/2)	1 (♀)	32 (18/14)	1 : 1 774
reakcja alergiczna	1 (♀)	12 (5/7)	8 (2/6)	1 (♀)	22 (9/13)	1 : 2 580
alloimmunizacja poprzetoczeniowa	2 (2/0)	4 (4/0)	0	0	6 (6/0)	1 : 9 460
poprzetoczeniowe przeciążenie układu krążenia (TACO)	3 (2/1)	0	1 (♂)	0	4 (2/2)	1 : 14 190
wstrząs anafilaktyczny	0	0	1 (♀)	0	1 (♀)	1 : 56 763
ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (TRALI)	1 (♂)	0	0	0	1 (♂)	1 : 56 763
poprzetoczeniowa reakcja hipotensyjna	1 (♀)	0	0	0	1 (♀)	1 : 56 763
ostra reakcja hemolityczna	0	0	1 (♂)	0	1 (♂)	1 : 56 763

Zwraca uwagę fakt, że grupę pacjentów, u których wystąpiła alloimmunizacja poprzetoczeniowa stanowiły wyłącznie kobiety. Nie zaobserwowano wyraźniej przewagi którejkolwiek z płci w pozostałych grupach. Nieopisane w Tabeli 14 przypadki oceniono jako będące wynikiem toczącego się procesu chorobowego (choroby podstawowej). Co istotne,

nie zaobserwowano odczynów poprzetoczeniowych związanych z przetoczeniem zakażonego składnika krwi. Przeprowadzone badania bakteriologiczne wykluczyły taką możliwość.

Tabela 15. Występowanie niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych

Składnik krwi	Oddział/Klinika
KKCz	Hematologii – 9
	Chorób Wewnętrznych – 7
	Chirurgii Urazowo-Ortopedycznej i Nowotworów Narządu Ruchu – 2
	Nefrologiczny – 2
	Chirurgii Naczyniowej – 2
	Chirurgii Endokrynologicznej – 2
	Udarowy – 2
	Brachyterapii – 2
	Chemioterapii – 2
	Szpitalny Oddział Ratunkowy – 1
	Reumatologii – 1
KKP	Hematologii – 17
	Chemioterapii – 2
	Chirurgii Endokrynologicznej – 1
FFP	Hematologii – 4
	Szpitalny Oddział Ratunkowy – 4
	Chirurgii Endokrynologicznej – 3
	Gastroenterologii – 1
	Reumatologii – 1
	Chorób Wewnętrznych – 1
	Chirurgii Onkologicznej – 1
	Urologii – 1
	Intensywnej Opieki Medycznej – 1
	Udarowy – 1

Dane przedstawione w Tabeli 15 wskazują, że niepożądane reakcje poprzetoczeniowe najczęściej występują u pacjentów Kliniki Hematologii, niezależnie od typu podanego składnika krwi (17 przypadków po KKP, 9 – KKCz, 4 – FFP). Po przetoczeniu KKCz również dość często u biorców przebywających na Oddziale Chorób Wewnętrznych obserwowano występowanie odczynu po transfuzji (7 przypadków). Niepożądane reakcje poprzetoczeniowe po podaniu FFP występowały tak samo często na SOR jak i w Klinice Hematologii, jeden przypadek mniej zarejestrowano na Oddziale Chirurgii Endokrynologicznej. Odczyny, które zaistniały na pozostałych oddziałach były to jednorazowe przypadki (max. 2 zdarzenia).

11. Dyskusja

Przetaczanie KKCz jest jedną z powszechnie stosowanych metod leczenia ostrej, wynikającej z różnych przyczyn klinicznych, jak i przewlekłej niedokrwistości w przebiegu chorób nowotworowych [18, 223]. Przez wiele lat przetaczanie krwi i jej składników utożsamiano jedynie z korzyściami klinicznymi [18]. Obecnie wiadomo, że leczenie to związane jest także z ryzykiem występowania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych, czasami kończącymi się zgonem [1, 224]. Jednakże, mechanizmy odpowiedzialne za występowanie różnorodnych, często złożonych poprzetoczeniowych zdarzeń i reakcji nie są w pełni wyjaśnione [100, 225]. Wiele retrospektywnych badań obserwacyjnych wykazało zwiększoną częstość występowania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych po podaniu dłużej przechowywanych jednostek KKCz w porównaniu ze „świeżymi” [22-24, 88, 226], natomiast ostatnie randomizowane badania kontrolne (tj. ABLE [138], RECESS [135], INFORM [227]) nie potwierdziły tej zależności [18, 26, 28-30, 135, 138, 227]. Obecnie, w świetle dostępnych kontrowersyjnych danych trudno jednoznacznie stwierdzić bezpieczeństwo i skuteczność stosowania długo przechowywanych (14.-42.-dniowych) KKCz [100, 226]. Konieczne jest kontynuowanie badań *in vitro* mających na celu wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw niekorzystnych klinicznych konsekwencji przetoczenia tego składnika krwi.

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej było określenie czy zmiany zachodzące w długo przechowywanych KKCz (w ostatnim dniu terminu ważności) promują ich działanie pro-zakrzepowe, pro-utleniające oraz czy modulują żywotność i proliferację komórek nowotworowych oraz jaki wpływ na te procesy ma filtrowanie jednostek KKCz przed przechowywaniem. Zrealizowanie celu badawczego mogłoby stać się argumentem do przyszłych zmian obecnie obowiązujących zaleceń dotyczących terminu przydatności jednostek czy wskazania do stosowania świeżych KKCz w wybranych grupach biorców.

W skład frakcji bezkomórkowej jednostek KKCz stosowanych w badaniach, nazywanej również nadsączem lub supernatantem, wchodzi składniki pozwalające utrzymać odpowiednią żywotność krwinek czerwonych podczas przechowywania w RCKiK, tj. chlorek sodu, adenina, glukoza, mannitol (składniki płynu wzbogacającego; SAGM) oraz antykoagulant (CPD) [2, 64]. Zmiany zachodzące w krwinkach i supernatancie jednostki KKCz wynikające z ich przechowywania są dobrze udokumentowane [39]. Dotychczas, w supernatancie zidentyfikowano śladowe ilości osocza [64, 65], leukocyty i płytki krwi dawcy (w ilości zależnej od sposobu przygotowania jednostki) [65, 228] oraz gromadzące się wraz z upływem

czasu przechowywania liczne substancje bioaktywne, tj. zewnątrzkomórkowa Hb i jej pochodne (hem, żelazo), enzymy proteolityczne, cytokiny prozapalne, chemokiny, mediatory immunomodulujące i wazoaktywne, lipidy, MPs (w głównej mierze uwalniane z erytrocytów) [35, 38, 39, 47, 62-64, 106]. Jedną z metod umożliwiających zmniejszenie ilości bioaktywnych składników w supernatancie KKCz jest usunięcie przed przechowywaniem zanieczyszczających go innych komórek krwi obecnych w jednostce poprzez wyizolowanie kożuszka leukocyтарno-płytkowego i/lub zastosowanie filtrów antyleukocyтарnych [1, 35].

Pierwszym etapem w realizacji postawionego celu badawczego było scharakteryzowanie wykorzystanych w badaniach supernatantów KKCz otrzymanych w 1. oraz 42. dniu przechowywania oraz określenie różnic pomiędzy tymi jednostkami wynikających z przeprowadzonego procesu filtrowania. Do tej oceny wybrano przede wszystkim typowe parametry, takie jak poziom hemolizy, stresu oksydacyjnego i frakcji EMPs. Wskaźniki te ilościowo nieco się różnią w zależności od procedur stosowanych podczas otrzymywania jednostek KKCz w różnych bankach krwi. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że przechowywanie KKCz w warunkach *ex vivo* skutkuje znaczącym wzrostem hemolizy (w ostatnim dniu przechowywania), co odzwierciedlają podwyższone stężenia zewnątrzkomórkowej Hb, hemu i żelaza w supernatancie w porównaniu z 1. dniem (Tabela 10). Jak powszechnie wiadomo poziom hemolizy w KKCz zwiększa się wraz z czasem przechowywania [60, 84]. Znaczące różnice w stężeniu wolnej Hb w supernatancie obserwowane są dopiero w ostatnich dniach przechowywania [84]. Interesujący jest fakt, że KKCz otrzymane od dawców płci męskiej charakteryzują się większym poziomem hemolizy w porównaniu do jednostek uzyskanych od kobiet [84]. Międzyosobnicza zmienność genetyczna jest obecnie uznawana za ważny czynnik determinujący predyspozycję do hemolizy *ex vivo* [55]. Proces filtrowania jednostek KKCz stosowanych w badaniach wpływał na wzrost hemolizy w supernatancie w dniu pobrania (dzień 1.), co sugeruje, że stosowane metody preparatyki, a w tym przypadku zastosowanie filtrów antyleukocyтарnych (BioR Flex, Fresenius Kabi AG filter) nie jest obojętne dla jakości otrzymywanych UKKCz. Może świadczyć o tym, że krwinki czerwone dawców charakteryzowały się predyspozycją do hemolizy podczas filtrowania, co zostało zaobserwowane również przez Antonelou i wsp. [229]. Jednakże, należy podkreślić fakt, iż wpływ ten jest niwelowany z upływem czasu, a w 42. dniu niefiltrowane KKCz wykazują znacznie wyższy poziom hemolizy niż jednostki poddane leukoredukcji (Tabela 10). Przeprowadzony rozdział elektroforetyczny białek zawartych w supernatantach potwierdził wzrost hemolizy w trakcie przechowywania ujawniający się poprzez pojawienie się charakterystycznego pasma odpowiadającego

monomerom Hb (Rycina 17). Dzieciatkowska i wsp. [131] w swoich badaniach obejmujących analizę proteomiczną supernatantu uzyskali podobne elektroferogramy. Przetoczenie długo przechowywanych KKCz charakteryzujących się wysokim poziomem hemolizy (nagromadzenie żelaza, wolnej Hb, a także EMPs zawierających Hb) może skutkować wzrostem poziomu żelaza niezwiązanego z transferyną w krążeniu biorcy i występowaniem niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych [82, 83, 230]. Zewnątrzkomórkowa Hb po przetoczeniu gromadzi się w śledzionie, wątrobie i nerkach pacjenta [92], co może być przyczyną zwiększonej skłonności do infekcji czy nasileniem stanu zapalnego u biorców [82, 83].

Wraz z wydłużeniem czasu przechowywania obserwowano również podwyższony poziom stresu oksydacyjnego, objawiający się obniżeniem CPA oraz obecnością grup karbonylowych w białkach supernatantów (Tabela 10, Rycina 18). Karbonylacja białek jest nieodwracalną modyfikacją, a zależna od czasu przechowywania obecność tego markera stresu oksydacyjnego w KKCz może wpływać na prawidłowe funkcjonowanie krwinek czerwonych [231]. Delobel i wsp. [231] zidentyfikowali 142 karbonylowane białka w cytozolu komórek oraz 20 utlenionych białek błonowych. Zależne od czasu przechowywania zmiany w karbonylomie wykazano tylko we frakcji cytozolowej [231]. Ta sama grupa badawcza wykazała dwukrotny wzrost ilości karbonylowanych białek w EMPs w trakcie przechowywania, co świadczy o tym, że komórki poprzez uwalnianie MPs usuwają utlenione białka [232]. Dotychczas badania dotyczące obecności grup karbonylowych w białkach znajdujących się w supernatantach KKCz nie zostały opublikowane przez innych badaczy.

Zaobserwowane znaczące zwiększenie populacji EMPs w trakcie przechowywania (Tabela 10) świadczyć może o nieodwracalnej utracie błony komórkowej w wyniku uwalniania mikropęcherzyków. Obserwacje komórek UKKCz pod mikroskopem kontrastowo-fazowym potwierdziły zmiany w morfologii erytrocytów wynikające z przechowywania. Na uzyskanych fotografiach wyraźnie widać w polu widzenia większą ilość komórek o kształcie zbliżonym do sferoechinocytów (mających ścisły związek z utratą błony w wyniku procesu uwalniania EMPs) w porównaniu do komórek o morfologii prawidłowej (dyskocytów) (Rycina 16). Dodatkowo, proces uwalniania EMPs, jak i zmiany morfologiczne krwinek czerwonych potwierdzono przy pomocy fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego z wykorzystaniem znacznika błonowego Neuro-DiO (Rycina 16). Opisanie zmiany morfologiczne komórek w przechowywanych KKCz/SAGM przy pomocy różnych technik obrazowania mikroskopowego obserwowali również inni badacze [229, 233]. Mustafa i wsp. [233] dodatkowo powiązali zachodzące zmiany morfologiczne erytrocytów ze wzrostem modyfikacji

oksydacyjnych zachodzących w tych komórkach w trakcie przechowywania. W ostatnio opublikowanych badaniach Bardyn i wsp. [234] zaobserwowali po 35. dniach przechowywania nieodwracalne zmiany w morfologii erytrocytów, którym towarzyszył wykładniczy wzrost ilości EMPs i hemolizy w jednostce UKKCz/SAGM, natomiast po 42. dniach wykazano wzrost poziomu stresu oksydacyjnego oceniony na podstawie stężenia glutationu w komórkach (obniżenie tego parametru o 25%) [234]. W związku z tym, iż zdecydowaną większość wszystkich uwalnianych MPs podczas przechowywania KKCz stanowią EMPs, zarówno w jednostkach niefiltrowanych [107], jak i filtrowanych [106, 235] podjęto decyzję o oznaczeniu zmian w tej właśnie populacji. Ze względu na różne metody oznaczania EMPs w supernatantach KKCz [68, 69, 106, 229, 234, 236] dokładne ilościowe porównanie wyników własnych z wynikami innych badaczy jest niestety niemożliwe.

W filtrowanych jednostkach KKCz zarówno poziom hemolizy, stresu oksydacyjnego, jak i uwalnianie EMPs, pod koniec okresu przechowywania, były istotnie niższe w porównaniu z KKCz nie poddanymi leukoredukcji (Tabela 10). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami innych autorów wiele z obserwowanych zmian/uszkodzeń krwinek czerwonych wynikających z przechowywania zachodzi w mniejszym stopniu po usunięciu większości leukocytów i płytek krwi dawcy zanieczyszczających KKCz [42, 228, 229, 237]. Filtrowanie jednostek znacząco zmniejszało, m.in. poziom hemolizy, nieodwracalne zmiany morfologiczne komórek (echinocytozę), stres oksydacyjny, starzenie krwinek czerwonych [229] oraz uwalnianie EMPs [229, 236]. Zespół Almizraq i in. [238] udokumentował ostatnio wpływ różnych metod preparatyki krwi na jakość i bezpieczeństwo przetaczania KKCz, co w głównej mierze związane jest z działaniem immunomodulacyjnym supernatantów [238]. Filtrowane KKCz/SAGM charakteryzowały się najmniejszą ilością MPs w supernatancie, co bezpośrednio wpływało na ich mniejszą aktywność immunologiczną (immunosupresyjną, zapalną) względem pozostałych typów jednostek KKCz [238]. Podsumowując, otrzymane na tym etapie wyniki są zgodne z wcześniej opublikowanymi badaniami dokumentującymi różnice w supernatantach KKCz wynikające z przechowywania oraz zastosowanej metody preparatyki (tj. filtrowanie).

Kolejnym zadaniem badawczym w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena wpływu uprzednio scharakteryzowanych supernatantów KKCz na parametry czynnościowe (aktywację i reaktywność) płytek krwi. Przetaczanie „starszych” KKCz (przechowywanych ponad 14 dni) pacjentom urazowym oraz z chorobami układu krążenia może być związane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych, tj. ostre uszkodzenie płuc, niewydolność wielonarządowa, jak również zakrzepica żył głębokich i tętnic,

udar oraz zwiększone ryzyko śmierci biorcy [22, 24, 86, 225, 239, 240]. Mechanizmy leżące u podstaw występowania incydentów zakrzepowych związanych z okołoperacyjnym przetoczeniem KKCz są słabo poznane [241]. Związek pomiędzy czasem przechowywania KKCz, a występowaniem powikłań zakrzepowych u biorców nie został wykazany we wszystkich przeprowadzonych badaniach [242, 243]. Eksperymenty wykonane w warunkach *in vitro* dowiodły, iż supernatanty z dłużej przechowywanych KKCz posiadają zdolność do osłabiania funkcji monocytów [244], aktywowania i pobudzania neutrofilii [245] oraz wywoływania reakcji zapalnych [246]. Mikrocząstki uwalniane z erytrocytów do supernatantu w trakcie przechowywania aktywują szlaki pro-koagulacyjne poprzez ekspozycję PS (powierzchnia do tworzenia kompleksów tenazy i protrombinazy) [106] oraz przez wytwarzanie trombiny w sposób zależny od czynnika XI [69]. Dane z 2020 roku wskazują, że EMPs mogą bezpośrednio aktywować czynnik XII oraz prekalikreinę, co skutkuje aktywacją czynnika IX [117, 118]. W literaturze dostępne są dane dotyczące występowania koagulopatii związanej z rozcieńczeniem krwi w wyniku transfuzji składników krwi podczas masywnych przetoczeń [247]. Natomiast nie ma jednoznacznego stanowiska naukowców w kwestii bezpośrednich skutków działania supernatantów KKCz na czynność płytek krwi [246, 248]. Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazują na hamowanie agregacji PLTs przez supernatanty z przechowywanych niefiltrowanych KKCz [248]. Z drugiej strony, pojawiły się także dane, w których obserwowany był wzrost ilości agregatów leukocytarнопłytkowych po inkubacji krwi pełnej z takimi supernatantami, co może świadczyć o tym, że płytki krwi były przez nie aktywowane [246]. Dowiedzione zostało, iż niedokrwistości hemolityczne, tj. talasemia czy niedokrwistość sierpowatokrwinkowa, związane są z występowaniem nadkrzepliwości i zwiększonej aktywacji PLTs pacjentów w wyniku wewnątrznaczyniowej hemolizy i wytwarzania RFT przez uwolnioną Hb z krwinek czerwonych [249, 250].

Kluczowym założeniem przeprowadzonych badań było wykazanie, że supernatanty w ilości odpowiadającej przetoczeniu *in vivo* dwóch jednostek KKCz (stosunek supernatantu do badanego materiału biologicznego wynosił 1:9 (v/v); ilość podawanych jednostek powszechnie stosowana w praktyce lekarskiej) mogą zaburzać funkcje płytek krwi, co dotychczas nie zostało ustalone i stanowi nowatorskie podejście do tematu. W przeprowadzonych wcześniejszych badaniach działanie supernatantów oceniano w warunkach doświadczalnych, mniej istotnych z klinicznego punktu widzenia, w których stosunek objętościowy supernatantu do PRP był równy 1:1 [63] lub do pełnej krwi 1:2 [248, 251], co odpowiadałoby przetoczeniu odpowiednio 20. lub 10. jednostek KKCz,

co może się wydarzyć, ale w sytuacji masowych transfuzji przeprowadzanych w przypadkach rozległych zagrażających życiu krwotoków.

W pierwszej kolejności oceniono wpływ supernatantów KKCz i ich filtratów (zawierających substancje o masie <10 kDa) na zdolność przylegania niestymulowanych oraz aktywowanych trombiną PLTs (zawieszonych w buforze Tyroda) do białek adhezyjnych fibrynogenu oraz kolagenu typu I. Adhezja PLTs jest pierwszym etapem hemostazy pierwotnej oraz aktywacji tych komórek [252]. Filtraty z supernatantów jednostek KKCz, w szczególności niefiltrowanych, znacząco zwiększają aktywację i reaktywność PLTs w porównaniu do supernatantów, z których je uzyskano (Rycina 19 i 20B), co pozwala wnioskować, że za zwiększenie zdolności adhezyjnych PLTs w głównej mierze mogą odpowiadać substancje małocząsteczkowe (o wielkości poniżej 10 kDa), prawdopodobnie pochodzące z białych krwinek i płytek krwi, obecne w supernatantach. Filtrowanie jednostek KKCz przed przechowywaniem znacząco obniża ilość bioaktywnych substancji zanieczyszczających, ale podczas rutynowego przechowywania filtrowanych KKCz nadal dochodzi do akumulacji niektórych mediatorów prozapalnych, jak i lipidów [35]. Bioaktywne lipidy czy małocząsteczkowe chemokiny mogą być obecne w supernatantach „świeżych” KKCz z powodu mechanicznego uszkodzenia komórek krwi w wyniku stosowanych procedur preparatyki krwi w bankach krwi. Sugeruje się, że zależny od czasu wzrost stężenia cytokin w przechowywanych jednostkach KKCz związany jest z kontrolowanym ich uwalnianiem przez nienaruszone krwinki czerwone, ale mechaniczne uszkodzenie komórek może również pobudzać uwalnianie cytokin [171], co może tłumaczyć ich wysokie stężenie w jednodniowych jednostkach KKCz. Biorąc pod uwagę sposób otrzymywania filtratów supernatantów KKCz do badań, należy założyć, że nie zawierały one w swym składzie MPs. Zgodnie z informacją producenta zastosowana membrana posiada pory o średnicy w zakresie 2,9 – 5,0 nm, co jednoznacznie potwierdza, iż MPs jako pęcherzyki o wielkości 0,1 – 1,0 µm czy mniejsze egzosomy (40 – 100 nm) [253] nie są obecne w badanych supernatantach. Co ciekawe, Aung i wsp. [106] zaobserwowali, że usunięcie MPs (wykorzystując filtr o średnicy porów 0,22 µm) z supernatantów filtrowanych KKCz/SAGM, otrzymanych w 42. dniu, zmniejszyła ilość MPs eksponujących PS, ale nie obniżało jego aktywności pro-zakrzepowej zależnej od fosfolipidów, co wskazuje, że cząsteczki mniejsze niż MPs promują aktywność pro-koagulacyjną supernatantów. Ze względu na brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy adhezją płytek krwi nietraktowanych, a inkubowanych z roztworem SAGM wykluczono wpływ samego roztworu wzbogacającego SAGM na zdolności adhezyjne PLTs. Nie wykazano także wpływu czasu przechowywania KKCz na właściwości adhezyjne PLTs. Uzyskane wyniki

sugerują, że przetaczanie niefiltrowanych KKCz może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka występowania zdarzeń zakrzepowo-zatorowych u biorców.

Następnie sprawdzono czy substancje obecne w supernatantach wpływają na tworzenie agregatów płytkowych poprzez pomiar agregacji PLTs metodą turbidymetryczną w PRP. Odpowiedź PLTs po stymulacji fizjologicznym agonistą uległa znacznemu wzmocnieniu w obecności supernatantów z niefiltrowanych KKCz otrzymanych w 1. dniu przechowywania oraz filtratów uzyskanych z niefiltrowanych supernatantów w 1. oraz 42. dniu (Rycina 21). Wzmoczoną agregację PLTs indukowaną kolagenem wywoływały małowczątkowe składniki (<10 kDa) obecne w supernatantach z niefiltrowanych KKCz. Obserwowany efekt nie wykazywał zależności względem czasu przechowywania jednostki. Bezpośredni wpływ roztworu wzbogacającego SAGM na agregację PLTs został wykluczony. Otrzymane wyniki nie są zgodne z wcześniejszym doniesieniem [248], w którym autorzy wykazali, że supernatanty przechowywanych niefiltrowanych jednostek KKCz hamują agregację PLTs indukowaną kolagenem poprzez zmniejszanie ekspresji powierzchniowego receptora integrynowego GP IIb/IIIa dla fibrynogenu. Różnice pomiędzy przedstawionymi danymi, a uzyskanymi wynikami własnymi mogą być związane z zastosowaniem odmiennych warunków przeprowadzanych eksperymentów. Badania Matheu i wsp. [248] obejmowały pomiar agregacji PLTs w krwi pełnej, stosunek supernatantu do krwi wynosił 1:2 (v/v) (w badaniach własnych 1:9), a płynem uzupełniającym wykorzystanym do przechowywania krwinek czerwonych był roztwór AS-5, którego skład znacznie odbiega od płynu SAGM - powszechnie stosowanego w krajach europejskich, Kanadzie, Australii i Nowej Zelandii. Dodatkowo w cytowanej pracy brak jest informacji o bezpośrednim wpływie płynu AS-5 na agregację PLTs. Na brak zgodności wyników eksperymentalnych mogły wpłynąć także różnice w sposobie przygotowywania jednostek KKCz w bankach krwi i/lub różnice osobnicze pomiędzy krwinkami czerwonymi dawców wynikające z ich odmiennej podatności na stres oksydacyjny czy hemolizę w warunkach *ex vivo*. Natomiast, wyniki zgodne z otrzymanymi wynikami własnymi uzyskali Spinelli i wsp. [63]. Autorzy zaobserwowali istotny wzrost agregacji PLTs indukowanej ADP po inkubacji PRP z supernatantami (1:1, v/v) z przechowywanych (<8. i >20. dni) niefiltrowanych KKCz/AS-1 w porównaniu do tych z 1. dnia [63]. Supernatanty z filtrowanych KKCz niezależnie od czasu przechowywania nie miały wpływu na agregację PLTs [63], co jest zgodne z wynikami zaobserwowanymi w przyjętym układzie badawczym (Rycina 21). Wyniki prospektywnego badania obserwacyjnego (TRANSFUSION-2) [254] przeprowadzonego w grupie 61. pacjentów (33. z OZW i 28. pacjentów hospitalizowanych z powodu innych chorób serca)

także wykazały wzrost reaktywności PLTs, szczególnie po stymulacji ADP, u biorców otrzymujących jednostki KKCz/SAGM.

W celu określenia wpływu supernatantów KKCz na parametry czynnościowe PLTs w warunkach możliwie najbardziej zbliżonych do fizjologicznych, odpowiedź PLTs mierzono w krwi pełnej z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Supernatanty KKCz stymulowały uwalnianie PMPs oraz tworzenie PAs w stopniu zbliżonym do zastosowanych fizjologicznych agonistów (kolagenu, ADP) (Rycina 22 i 23), jak również zwiększały ekspresję powierzchniowych markerów aktywacji PLTs, selektyny P i aktywnej formy receptora integrynowego GP IIb/IIIa (Rycina 24 i 25), co jednoznacznie dowodzi, że mają one działanie stymulujące na PLTs. Dodatkowo, zaobserwowano, iż supernatanty mogą oddziaływać w sposób synergistyczny lub addytywny z fizjologicznymi agonistami (kolagenem - Rycina 24B i 25B oraz ADP - Rycina 24C i 25C). Warto zauważyć, że w PLTs stymulowanych kolagenem supernatanty KKCz nie wpływają znacząco na tworzenie PAs (Rycina 23B), co pozostaje w głównej mierze w zgodzie z wynikami agregacji oznaczonej metodą turbidymetryczną (Rycina 21). Supernatanty niefiltrowanych jednostek KKCz, niezależnie od dnia otrzymania, w większym stopniu przyczyniały się do wzrostu agregacji PLTs (Rycina 23A), co sugeruje, że obecne w supernatantach substancje bioaktywne prawdopodobnie pochodzą z resztkowych leukocytów i PLTs (zanieczyszczających ten składnik krwi). Obserwowany wzrost aktywacji PLTs w krwi pełnej pod wpływem działania supernatantów, wraz z tendencją do jej zwiększenia z czasem przechowywania, prawdopodobnie związany jest ze wzrostem stresu oksydacyjnego w jednostkach KKCz wynikającym ze zdolności wolnej Hb i jej pochodnych do wytwarzania RFT. Powszechnie wiadomo, że przeciążenie żelazem (szczególnie u biorców wielokrotnych), na skutek zwiększonej podaży wolnej Hb i hemu, może powodować uszkodzenie komórek, tkanek i narządów wynikające z rosnącego poziomu stresu oksydacyjnego, związanego z obecnością wspomnianych substancji, które są źródłem reaktywnych form tlenu i azotu [255, 256]. Aktywację PLTs w krwi pełnej po ekspozycji na tzw. układy generujące RFT (pochodzące z krwinek czerwonych, tj. wolna Hb [257] czy granulocytów obojętnochłonnych) opisywano już w literaturze [250, 258]. Dostępne dane sugerują, że RFT są stymulatorami agregacji PLTs na różnych poziomach szlaków sygnałowych, np. poprzez pobudzenie metabolizmu kwasu arachidonowego, aktywację kinaz tyrozynowych, czy napływ jonów wapnia. Dowiedziono również, że Hb uwolniona z uszkodzonych krwinek czerwonych, już nawet w nanomolowych stężeniach, stymuluje agregację PLTs [250]. W zastosowanym układzie doświadczalnym wolna Hb oraz hem, obecne w badanych supernatantach KKCz, promowały środowisko

pro-oksydacyjne w krwi pełnej. W procesie samoutleniania wolna Hb wytwarza anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), który następnie uczestniczy w powstawaniu innej RFT jaką jest nadtlenek wodoru (H_2O_2). Ponadto, hem jako źródło żelaza bierze udział w tworzeniu rodników hydroksylowych w reakcji Fentona [255]. Wolny hem jest jednym z czynników wywołujących hemolizę krwinek czerwonych. Związek ten ma zdolność wnikania do hydrofobowej części dwuwarstwy fosfolipidowej, gdzie uczestniczy w powstawaniu nadtlenków lipidów bezpośrednio zwiększających przepuszczalność błony komórkowej [255]. Podsumowując, w środowisku pełnej krwi hem, nagromadzony w supernatantach przechowywanych KKCz, może zwiększać uwalnianie wolnej Hb. Wzrost hemolizy może z kolei generować RFT w ilości wystarczającej do stymulacji PLTs. Pobudzające działanie supernatantów na PLTs mogło być również spowodowane obecnością MPs różnego pochodzenia w jednostkach KKCz, głównie EMPs, których zdolność do wytwarzania trombiny w wewnątrzpochodnym szlaku krzepnięcia wykazano nawet przy braku czynnika tkankowego [106]. W związku z niewystarczającą ilością materiału biologicznego nie przeprowadzono badań wpływu filtratów (<10 kDa) na PLTs w krwi pełnej metodą cytometrii przepływowej.

Z drugiej strony, zwiększona wrażliwość PLTs na kolagen po inkubacji z sNLR1 lub filtratami, niezależnie od czasu przechowywania, zaobserwowana w badaniach przeprowadzonych metodą turbidymetryczną (Rycina 21) nie może być związana z wytwarzaniem RFT. W osoczu bogatopłytkowym, zawierającym duże stężenie przeciwutleniaczy/zmiataczy wolnych rodników, a także białka wiążące wolną Hp (haptoglobina) i hem (hemopeksyna) [259], przy stosunku objętościowym PRP:supernatant (9:1), jest bardzo mało prawdopodobne, aby produkty rozpadu Hb obecne w supernatancie mogły inicjować tworzenie RFT. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że mechanizmy odpowiedzialne za aktywację i zwiększoną reaktywność PLTs pod wpływem supernatantów KKCz są złożone a pomiędzy gromadzącymi się w nich bioaktywnymi substancjami mogą zachodzić różne interakcje. Na tym etapie badań nie można zidentyfikować wszystkich substancji odpowiedzialnych za obserwowany efekt. Należy również pamiętać, iż nawet do 25% przetoczonych krwinek czerwonych może być usuwanych z krwioobiegu [82, 260], przez co znaczenie kliniczne niektórych zaobserwowanych zjawisk może nie być zauważalne *in vivo*. W badaniach przeprowadzonych na materiale biologicznym pochodzącym od ludzi trzeba też wziąć pod uwagę różnice międzyosobnicze pomiędzy dawcami, na które mogą wpływać takie czynniki, jak płeć, wiek, grupa krwi, styl życia, dieta, palenie papierosów, podatność krwinek czerwonych na stres oksydacyjny *ex vivo* [45, 47, 52, 54, 55] i wiele innych dotychczas nieznanych czynników. Pomimo dużej liczby przeprowadzonych niezależnych

eksperymentów nie wykazano istotnego wpływu filtrowania przed przechowywaniem, a czas przechowywania miał niewielki wpływ, na poziom niektórych badanych parametrów aktywacji PLTs indukowanej supernatantami. Brak istotnych statystycznie różnic w poziomach markerów aktywacji PLTs pomiędzy badanymi supernatantami można, przynajmniej częściowo wyjaśnić dużymi odchyleniami uzyskanych wyników, wynikającymi z różnic osobniczych między dawcami, których krew wykorzystano.

Podsumowując, uzyskane wyniki wyraźnie dowodzą, iż supernatanty KKCz stymulują aktywację i reaktywność PLTs pobranych od zdrowych ochotników *in vitro*, co może wyjaśniać występowanie incydentów zatorowo-zakrzepowych po przetoczeniu KKCz, w różnych grupach chorych, np. pacjentów z chorobami układu krążenia, po zabiegach operacyjnych, czy z nowotworami. Biorąc pod uwagę fakt, że badania przeprowadzono w warunkach doświadczalnych odpowiadających przetoczeniu 2 jednostek KKCz (przy stosunku objętościowym supernatantu do krwi/PRP wynoszącym 1:9) można wnioskować, że filtrowanie i „wiek” przetoczonych KKCz mogą mieć mniejsze znaczenie przy podawaniu biorcy do 2 jednostek/dobę (w przeciwieństwie do np. masywnych transfuzji).

Ostatnim etapem w realizacji pierwszego zadania badawczego była ocena wpływu supernatantów KKCz na właściwości hemostatyczne osocza krwi poprzez oznaczenie powszechnie stosowanych parametrów diagnostycznych. Nie wykazano działania supernatantów, w zastosowanym stężeniu, na czasy krzepnięcia (TT, PT, APTT) (Rycina 29). Brak widocznego wpływu badanych supernatantów na właściwości hemostatyczne osocza może wynikać z ogólnego ograniczenia tych testów, tzn. ich stosunkowo niskiej czułości [261]. Parametry krzepnięcia (tj. PT, APTT, liczba PLTs) stosowane są zwyczajowo do określenia względnego udziału różnych składników krwi w przebiegu procesu hemostazy [261]. Dostępne dane literaturowe również nie dowiodły wpływu czasu przechowywania (do 21 dni) KKCz na krzepnięcie oznaczone przy pomocy wspomnianych testów diagnostycznych [261]. Sugeruje się, że za występowanie incydentów pro-zakrzepowych po przetoczeniu KKCz mogą odpowiadać obecne w jednostkach resztkowe płytki krwi oraz czynniki krzepnięcia [261].

Kolejnym aspektem badanym w pracy była ocena działania supernatantów KKCz na wybrane linie ludzkich komórek nowotworowych oraz określenie ich wpływu na cytotoksyczność cisplatyny wobec tych komórek. Mechanizm terapeutycznego działania zastosowanego leku onkologicznego, na bazie platyny o silnych właściwościach cytostatycznych, polega na bezpośredniej interakcji z DNA poprzez tworzenie wewnątrzniowych wiązań hamujących replikację, co prowadzi do zatrzymania cyklu

komórkowego, a następnie apoptozy [262, 263]. Mechanizm przeciwnowotworowego działania cisplatyny nie jest do końca poznany. Wykazano, że zaledwie 1% cisPt obecnej w komórce wiąże się z jądrowym DNA. Pozostały odsetek reaguje ze składnikami błony oraz cytoplazmy, co świadczy o tym, że lek ten może również wykazywać działanie cytotoksyczne poprzez mechanizmy niezależne od wiązania jądrowego DNA [264], m.in. poprzez wywoływanie wytwarzanie RFT [265]. Cisplatyna i jej analogi są stosowane w leczeniu różnych typów nowotworów, tj. białaczka, rak piersi, jajnika, nerki czy płuc, zarówno w monoterapii, jak i terapii skojarzonej z innymi lekami [263]. Pacjenci onkologiczni często wymagają transfuzji KKCz z powodu wynikającej z choroby nowotworowej niedokrwistości, której przyczyną może być także radio- i/lub chemioterapia, przewlekła niewydolność nerek czy utrata krwi podczas zabiegu chirurgicznego [140, 142, 144].

Pierwszy etap badań *in vitro* przeprowadzono na komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (linia komórkowa K-562), ponieważ anemia najczęściej występuje u pacjentów chorych na nowotwory hematologiczne, w przypadku białaczek związana jest z nacieczeniem szpiku kostnego przez komórki nowotworowe [34, 142]. W związku z silnym działaniem cytotoksycznym supernatantów dodawanych w ilości 10% i 20% objętości zawiesiny komórek K-562 oraz brakiem znamienych statystycznie różnic w żywotności komórek K-562 po inkubacji z supernatantem w ilości 2%, jako optymalną dawkę supernatantu do dalszych badań wybrano 5%. Ilość ta umożliwiła także zaobserwowanie działania supernatantów KKCz w obecności leku przeciwnowotworowego.

Badania własne wykazały cytotoksyczny wpływ supernatantów z niefiltrowanych KKCz na komórki K-562, niezależnie od długości przechowywania *ex vivo* oraz obecności leku przeciwnowotworowego, w komercyjnym teście do oceny przeżywalności (Rycina 30C). Podobne działanie supernatantów z niefiltrowanych jednostek, w obecności cisplatyny, wykazano w immunoenzymatycznym teście, o wysokiej czułości, oceniającym zdolności proliferacyjne poprzez ilość wbudowanego BrdU w miejsce tymidyny do DNA komórek proliferujących (Rycina 31). Dodatkowo, badania metodą ELISA dowiodły, że zdolności proliferacyjne komórek zmniejszyły się pod wpływem supernatantów z filtrowanych KKCz oraz niefiltrowanego z 1. dnia (Rycina 31). W związku z powyższym podjęto próbę wyjaśnienia przyczyny spadku żywotności i hamowania proliferacji komórek K-562 poprzez określenie poziomu wewnątrzkomórkowych RFT, które potwierdziło wzrost ilości RFT generowanych w komórkach po inkubacji z supernatantami KKCz w badanych układach (Rycina 32). Nasilenie OS w komórkach może przyczyniać się do powstawania uszkodzeń DNA. W alkalicznej wersji testu kometowego zaobserwowano tendencję do wzrostu uszkodzeń

DNA po inkubacji z supernatantami (Rycina 33). Przy mniejszym stężeniu (5%) najsilniejsze działanie genotoksyczne wykazywał supernatant uzyskany z filtrowanego KKCz z 1. dnia. Silniejsze właściwości genotoksyczne supernatantów zaobserwowano przy zastosowaniu większej dawki (20%) (Rycina 33). Wiele czynników reguluje proces apoptozy, wewnątrzkomórkowymi czynnikami indukującymi apoptozę są m. in. uszkodzenia DNA, czy podwyższony poziom RFT [266, 267]. W związku z wykazaniem wzrostem tych dwóch parametrów podjęto decyzję o dokonanie oceny wpływu supernatantów na proces apoptozy komórek nowotworowych, poprzez oznaczenie aktywności enzymatycznej kaspaz.

Utrzymanie prawidłowej homeostazy organizmu jest możliwe dzięki mechanizmom zaprogramowanej (kontrolowanej genetycznie) śmierci komórkowej, tj. apoptoza. Uruchomienie szlaku sygnałowego wewnątrz- bądź zewnątrzpochodnego prowadzi m. in. do przekształcenia kaspaz w ich aktywne formy, a w konsekwencji do śmierci komórki. Kaspaza-9 bierze udział w inicjacji procesu apoptozy w wewnątrzpochodnym szlaku mitochondrialnym. Jej aktywacja powoduje wzbudzenie kaspazy-3 i 7, które pełnią rolę efektorową w fazie wykonawczej procesu apoptozy [266, 267].

Supernatanty otrzymane w 1. dniu przechowywania, niezależnie od sposobu przygotowania, zarówno w obecności, jak i bez leku przeciwnowotworowego, wzmagają proces apoptozy (Rycina 35A i B). Ponadto, zaobserwowano wzrost aktywności kaspazy-3/7 w obecności długo przechowywanego supernatantu z niefiltrowanego KKCz (Rycina 35A). Poprzez zahamowanie aktywności kaspaz (zastosowanie inhibitora kaspaz Z-VAD-FMK) potwierdzono, za pomocą testu CCK-8, że supernatanty wzmagają apoptozę komórek linii K-562 w badanym układzie eksperymentalnym (Rycina 35C).

Podsumowując, supernatanty KKCz, w szczególności uzyskane z niefiltrowanych jednostek oraz filtrowanych z 1. dnia, również w układzie badawczym z cisplatyną, promują apoptozę komórek K-562 poprzez działanie pro-oksydacyjne (wzrost produkcji RFT), i w konsekwencji genotoksyczne, co objawia się obserwowanym zmniejszeniem żywotności i hamowaniem proliferacji komórek. Uzyskane wyniki wskazują, iż jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za cytotoksyczne działanie supernatantów na komórki linii K-562 jest wzrost stresu oksydacyjnego, który może być spowodowany obecnością w nich produktów degradacji Hb. Ze względu na nowatorski charakter tej części badań i brak odniesienia w literaturze interpretacja uzyskanych wyników, jak i określenie ich klinicznego znaczenia jest trudne. Wolna Hb, hem i żelazo, dostarczane do organizmu biorcy z przetaczanym składnikiem krwi, są źródłem NTBI i mogą być toksyczne dla komórek i tkanek [89-91], m. in. poprzez udział w generowaniu RFT i nasilaniu stresu oksydacyjnego [15, 84, 90, 97, 98].

Przewlekły OS oraz towarzyszący mu stan zapalny są dobrze znanymi czynnikami wpływającymi na progresję choroby nowotworowej [153]. Komórki nowotworowe charakteryzują się znacznie wyższym poziomem RFT w porównaniu do prawidłowych komórek. Przyczyną tego są, m.in. dysfunkcje mitochondriów i podwyższony metabolizm komórek nowotworowych. Jednakże, bardzo wysokie stężenia wewnątrzkomórkowych RFT są wysoce toksyczne dla komórek, co może zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej hamującej obronę antyoksydacyjną komórek lub wzmagającej wytwarzanie RFT [268].

Nie można także wykluczyć, iż za zaobserwowane działanie cytotoksyczne odpowiadają również obecne w supernatantach cytokiny o aktywnościach przeciwnowotworowych, tj. interferony, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α , TGF- β [164]. Co istotne, wymienione cytokiny charakteryzują się działaniem plejotropowym, co oznacza, że w zależności od stężenia czy stopnia zaawansowania choroby, mogą wykazywać odmienne właściwości. Przykładowo, niskie ich stężenia mogą wpływać inicjująco na wzrost komórek nowotworowych, a wysokie oddziaływać hamująco. W supernatantach z niefiltrowanych KKCz nie wykazano wpływu przechowywania na wzrost stężenia IL-6 [120]. Ogólnie przyjęta teoria „pól cytokinowych” w mikrośrodowisku guza określająca stosunek ilości cytokin typu Th2 i Th3 w stosunku do Th1, pozwala w pewnym stopniu zrozumieć udział tych białkowych mediatorów w chorobach nowotworowych [34, 166].

Na podstawie uzyskanych wyników nie wykazano wpływu czasu przechowywania, ani sposobu przygotowania jednostki KKCz na komórki przewlekłej białaczki szpikowej. Filtracja nie zapobiega w pełni gromadzeniu się w supernatancie niektórych czynników zapalnych w istotnych klinicznie stężeniach. W związku z czym, przyczyną braku różnic może być obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i produktów ich utleniania w supernatantach, która została wykazana zarówno w jednostkach niefiltrowanych i filtrowanych w 42. dniu przechowywania [44]. Zaś, w 1. dniu przechowywania stężenie 12-HETE uczestniczącego w procesach, tj. stres oksydacyjny, stan zapalny, choroba nowotworowa, nie różni się pomiędzy jednostkami filtrowanymi i niefiltrowanymi [128].

U pacjentów onkologicznych poddawanych chirurgicznej resekcji guza zaobserwowano wyższy odsetek przerzutów i nawrotów choroby nowotworowej oraz ryzyka śmierci związany z okołoperacyjnym przetoczeniem KKCz [3, 147-149, 269]. Przyczyny tych zdarzeń upatruje się w immunosupresyjnym działaniu KKCz, polegającym na upośledzeniu funkcji komórek NK i cytotoksycznych limfocytów T [150]. Co więcej, do mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększone ryzyko progresji lub nawrotu choroby nowotworowej po przetoczeniu KKCz

zaliczane są stan zapalny oraz działanie mediatorów (tj. cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu) i składników krwi zdolnych do aktywacji angiogenezy i ścieżek przeżycia w transformowanych komórkach [153, 162].

Drugą część badań przeprowadzono na liniach komórek nowotworowych wywodzących się z guzów litych, tj. endometrialny gruczolakorak jajnika (A2780), gruczolakorak gruczołu krokowego (PC-3), gruczolakorak jelita grubego (LoVo), estrogenozależny gruczolakorak gruczołu piersiowego (MCF7) oraz linii nienowotworowej komórek nabłonka gruczołu piersiowego (MCF-10A), w takich samych dwóch układach (bez cisplatin i w obecności leku przeciwnowotworowego) jak w badaniach przeprowadzonych na linii K-562. W układzie bez cisPt, obserwowano spadek żywotności komórek wszystkich badanych linii nowotworowych w wyniku działania supernatantów KKCz z 1. dnia, zarówno niefiltrowanych, jak i filtrowanych (Rycina 36, 37A i B), żywotność komórek linii A2780 i PC-3 obniżał także supernatant filtrowanych KKCz z 42. dnia przechowywania (Rycina 36). Co ciekawe, supernatanty niefiltrowanych jednostek KKCz wraz z przechowywaniem traciły właściwości cytotoksyczne wobec komórek badanych linii (Rycina 36 i 37B), z wyjątkiem linii LoVo (Rycina 37A). W przypadku linii MCF7 opisaną zależność zaobserwowano także w filtrowanych jednostkach KKCz (Rycina 37B). Supernatanty nie miały wpływu na cytotoksyczne właściwości cisPt w badanych liniach komórek nowotworowych. Supernatanty długo przechowywanych KKCz nie wykazywały właściwości cytotoksycznych wobec nienowotworowej linii MCF-10A, a nawet wzmagaly żywotność tych komórek (Rycina 37C). Wzrost komórek unieśmiertelnionej linii MCF-10A możliwy jest w odpowiednim medium wzrostowym uzupełnionym stosownymi suplementami, wśród których obecne są czynniki wzrostu. Zgodnie z danymi literaturowymi, w supernatantach przechowywania KKCz gromadzą się czynniki wzrostu, tj. VEGF, EGF, TGF- β , IGF, bFGF [15, 38, 123, 171], co może tłumaczyć zaobserwowany wzrost żywotności komórek tej linii. Przeżywalność komórek MCF-10A hodowanych w obecności cisplatin i supernatantów była zbliżona do żywotności komórek nietraktowanych, co sugerowałoby znoszenie działania leku przez supernatanty (Rycina 37C). W kolejnej serii doświadczeń, zaobserwowano hamowanie proliferacji komórek nowotworowych pod wpływem supernatantów z 1. dnia (niefiltrowanych w komórkach LoVo, a filtrowanych w komórkach MCF7). Natomiast nie obserwowano wpływu długo przechowywanych niefiltrowanych jednostek KKCz na proliferację komórek obu tych linii (Rycina 38A i B). Ponadto, w komórkach linii nowotworowych, hodowanych w obecności supernatantów z KKCz, poziom wewnątrzkomórkowych RFT był ogólnie wyższy niż w komórkach kontrolnych,

ale nie był zależny od rodzaju supernatantu (Rycina 39A i B). Jedynie w komórkach linii MCF7 zaobserwowano niewielki wzrost poziomu uszkodzeń DNA w wyniku działania supernatantów z 1. dnia (Rycina 40B) chociaż był on w zakresie poziomu endogennych uszkodzeń DNA. Zaobserwowany brak zmian może wynikać z zastosowania zbyt małej dawki supernatantu, która w komórkach badanych linii nie wykazywała działania genotoksycznego. Jednocześnie, komórki MCF-10A w obecności supernatantów w porównaniu do komórek nietraktowanych, wykazywały większe zdolności proliferacyjne (Rycina 38C), przy czym supernatanty nie powodowały stresu oksydacyjnego w tych komórkach (brak wzrostu RFT) (Rycina 39C), ani uszkodzeń DNA (Rycina 40C).

Wyniki uzyskane w badaniach nad wpływem supernatantów KKCz na wybrane linie komórek nowotworowych wywodzących się z guzów litych były zgodne z tymi otrzymanymi w badaniach przeprowadzonych na komórkach K-562 i wykazały, że supernatanty KKCz nie wpływają na wzrost i rozwój komórek badanych linii nowotworowych. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia RFT w obecności supernatantów KKCz był cytotoksyczny dla komórek nowotworowych.

Różnice w otrzymanych wynikach pomiędzy liniami komórek nowotworowych a nienowotworową mogą wynikać z faktu, iż komórki nowotworowe charakteryzuje wysoki poziom stresu oksydacyjnego, w porównaniu do komórek prawidłowych, z których się wywodzą [271]. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, iż komórki linii MCF-10A ulegają unieśmiertelnianiu w sposób spontaniczny poprzez inkubację komórek w medium wzrostowym o niskiej zawartości jonów wapnia [272].

Udział stresu oksydacyjnego w progresji nowotworów układu krwiotwórczego (tj. ostra i przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, zespoły mielodysplastyczne) oraz litych (tj. rak prostaty, jelita grubego i piersi) jest potwierdzony, ale nadal jeszcze nie w pełni poznany [270]. Otrzymane wyniki nie są zgodne z danymi opublikowanymi przez Benson i wsp. [123], którzy opisali gromadzenie się czynników wzrostu i pro-nowotworowych cytokin w supernatantach KKCz oraz sugerowali, że substancje te mogą być odpowiedzialne za przyspieszanie progresji nowotworu trzustki. Następnie wykazali, iż supernatanty z długo przechowywanych KKCz (niefiltrowanych oraz filtrowanych) zwiększają proliferację i migrację komórek mysiego raka trzustki (Pan02), a podane dożylnie zdrowym myszom przyczyniały się do progresji raka trzustki [271]. Sprzeczność z uzyskanymi wynikami może być związana z zastosowaniem komórek mysiej linii nowotworowej raka trzustki, w przeciwieństwie do badań własnych, w których wszystkie linie były pochodzenia ludzkiego. W opisanych badaniach brak informacji o zastosowanym

płynie wzbogacającym do przechowywania krwinek czerwonych oraz dodawano supernatant w ilości 10% objętości medium w dołku, co również nie pozostaje bez wpływu na uzyskane wyniki. Istnieje prawdopodobieństwo, iż substancje obecne w supernatantach KKCz mogą wykazywać odmienne działanie w różnych typach nowotworów.

Ponadto, w literaturze dostępne są doniesienia o wpływie płytkopochodnego czynnika wzrostu (*ang. PDGF; platelet-derived growth factor*) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (*ang. VEGF; vascular endothelial growth factor*) gromadzących się w UKKCz, na wzrost proliferacji komórek ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (HepG2) *in vitro* [272]. W równoległe przeprowadzonym badaniu autorzy ci wykazali, że supernatanty z niefiltrowanych KKCz w większym stopniu wzmagały proliferację tych komórek [273]. W związku z tym, iż supernatanty otrzymywano w 35. dniu przechowywania [272] można podejrzewać, że krwinki czerwone nie były przechowywane w płynie wzbogacającym SAGM. Dodatkowo, rozbieżność z wynikami badań własnych może wynikać z faktu, iż komórki inkubowano z supernatantami przez 48 godzin oraz nie podano informacji na temat ilości supernatantu wykorzystywanego w badaniach [272]. Autorzy ci opisali wzrost całkowitego stężenia cytokin pro-nowotworowych (PDGF, VEGF, MCP-1, TNF- α , RANTES) w supernatantach przechowywanych jednostek filtrowanych, jak i niefiltrowanych [273, 274], co jest zgodne z wynikami Bensona i in. [123]. Stwierdzono również, że za wzrost stężenia PDGF oraz VEGF w supernatantach filtrowanych KKCz odpowiadają resztkowe PLTs, które ulegają aktywacji podczas przechowywania, a następnie uwalniają α -ziarnistości oraz ziarnistości gęste do frakcji bezkomórkowej jednostek [272]. Eksperymenty prowadzone przez Zhuang i wsp. [272-274] są zbliżone do założonego układu badawczego. Niestety porównanie otrzymanych wyników jest utrudnione ze względu na to, że prace zostały opublikowane w języku chińskim, przez co dostępne są jedynie pobieżne informacje zawarte w abstrakcie w języku angielskim.

W przeprowadzonych badaniach własnych czas inkubacji komórek z supernatantami (24 godziny) dobrano ze względu na dostępne dane dotyczące czasu potrzebnego na podwojenie ilości komórek w hodowli (*ang. population doubling time*), który w przypadku badanych linii komórkowych oscylował w zakresie od 18 do 34 godzin. Czas ten jednak mógł być zbyt krótki do właściwej oceny pro-proliferacyjnych właściwości supernatantów. We wszystkich przeprowadzonych eksperymentach wykluczono bezpośredni wpływ płynu SAGM na badane parametry. Wykazano także cytotoksyczne działanie cisplatyny na badane linie komórek, podobnie wpływ tego leku na linie ludzkich komórek hodowlanych wskazano we wcześniejszych doniesieniach literaturowych [275-280]. W związku z zastosowaniem

filtrów strzykawkowych o wielkości porów 0,22 μm przed zamrożeniem supernatantów wykorzystanych w badaniach na komórkach hodowlanych, w głównej mierze można wykluczyć udział mikrocząstek w mechanizmie działania supernatantów na badane komórki. Tayer i in. [235] w swoich badaniach także stosowali filtry 0,22 μm w celu usuwania MPs z próbek.

Na podstawie uzyskanych na tym etapie badań wyników można by sądzić, że przetaczanie KKCz nie wpływa na progresję nowotworów (przewlekłej białaczki szpikowej, endometrialnego gruczolakoraka jajnika, gruczolakoraka gruczołu krokowego oraz jelita grubego i estrogenozależnego gruczolakoraka gruczołu piersiowego). Dostępne dane literaturowe wskazują, iż pacjentom onkologicznym w miarę możliwości powinno się ograniczyć do minimum ilości przeprowadzanych przetoczeń [123].

W ostatniej części prezentowanej dysertacji oceniono wpływ przetoczenia KKCz lub KKP na poziom stresu oksydacyjnego (*ang. OS; oxidative stress*) w osoczu pacjentów z ostrą białaczką szpikową (*ang. AML; acute myeloid leukemia*) hospitalizowanych w Klinice Hematologii WWCOiT im. Mikołaja Kopernika w Łodzi. W literaturze dostępnych jest niewiele doniesień porównujących zmiany parametrów OS przed i po przetoczeniu KKCz we krwi biorców, natomiast obecnie brak jest badań w tej tematyce po transfuzji KKP. Warty podkreślenia jest także fakt, że dotychczas nie badano wpływu przetoczenia KKCz, czy KKP na zjawisko OS u chorych na AML, a jest to jedna z grup pacjentów, którym te składniki krwi są najczęściej przetaczane.

AML to rozrostowa choroba nowotworowa układu krwiotwórczego spowodowana niekontrolowaną proliferacją i nagromadzeniem niedojrzałych komórek blastycznych w szpiku kostnym. Komórki te pochodzą ze zmienionych nowotworowo prekursorowych komórek hematopoetycznych [281-283]. Prawdopodobieństwo zachorowania na AML zwiększa się z wiekiem, a szczyt zachorowalności osiągnięty jest około 65. roku życia [282]. Dane epidemiologiczne z 2014 roku wykazały, że wskaźnik zapadalności na AML u osób dorosłych w Polsce wynosił 4,1/100 000 mieszkańców, a współczynnik chorobowości był równy 10,9/100 000 obywateli [284].

OS odgrywa istotną rolę w patofizjologii chorób układu krążenia, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych, jak i wielu innych schorzeń [285, 286]. U pacjentów z AML stwierdza się podwyższony poziom OS w porównaniu do osób zdrowych [281]. Głęboka niedokrwistość ($\text{Hb} < 7 \text{ g/dl}$), neutropenia (neutrofile $< 1500/\mu\text{l}$) oraz małopłytkowość ($\text{PLTs} < 20 \text{ G/l}$), spowodowane nacieczeniem szpiku kostnego przez komórki białaczkowe lub stosowaną radio- i/lub chemioterapią, są istotnym problemem klinicznym u chorych

na AML [282]. W leczeniu tej grupy pacjentów onkologicznych oprócz terapii choroby podstawowej bardzo często wymagane jest przetaczanie składników krwi, tj. KKCz i/lub KKP.

W ramach tej części projektu badawczego wykonano oznaczenia szerokiego panelu markerów stresu oksydacyjnego w osoczu krwi chorych na AML (przed i 24 godziny po przetoczeniu składnika krwi), takich jak poziom grup –SH, grup karbonylowych, i 3-NT (markery oksydacyjno-nitracyjnych modyfikacji białek), AGE, TBARS (marker peroksydacji lipidów) oraz CPA, aktywność SOD i GST (markery ochrony antyoksydacyjnej), a także aktywność LDH (marker uszkodzenia komórek). Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów potwierdzono wzrost OS u pacjentów z AML w porównaniu do zdrowych ochotników. W wyniku choroby nowotworowej w osoczu pacjentów dochodziło do utleniania i modyfikacji białek (spadek ilość grup –SH (Rycina 42) oraz wzrost poziomu 3-NT (Rycina 44)), powstawania AGE (Rycina 45) oraz obniżenia CPA osocza (Rycina 47). Tsamesidis i in. [287] w ostatnio opublikowanym badaniu również stwierdzili, że w surowicy pacjentów z AML dochodziło do nasilenia OS, który związany był bezpośrednio ze spadkiem CPA i stężenia witaminy E oraz wzrostem poziomu MDA i RFT. W badaniach własnych nie wykazano istotnego statystycznie wzrostu stężenia TBARS (wyrażonym w molach MDA/ml osocza) (Rycina 46) w grupie chorych względem osób zdrowych, chociaż zaobserwowano tendencję wzrostową tego parametru, co może wynikać z zastosowanej spektrofotometrycznej metody oznaczenia, która jest mniej czuła niż metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykorzystana w badaniach zespołu pod kierownictwem Tsamesidis'a [287] czy przy użyciu techniki HPLC z tandemową spektrometrią mas [288]. Ze względu na wykazany znaczny spadek CPA u chorych podjęto decyzję o wykonaniu pomiaru aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GST). Otrzymane wyniki pokazały jedynie tendencję spadkową w aktywności tych enzymów u chorych, w porównaniu z grupą kontrolną (Rycina 48 i 49), co może być spowodowane dużym rozrzutem wyników na skutek różnic osobniczych w grupie uczestników badania czy czynnikami wpływającymi na OS, tj. przyjmowane leki, choroby współistniejące, dieta, stopień zaawansowania choroby podstawowej. Rasool i wsp. [281] oprócz wzrostu stężenia MDA, dodatkowo zaobserwowali obniżenie poziomu enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów u pacjentów chorych na AML.

Podczas wieloetapowego procesu nieenzymatycznej N-glikozylacji dochodzi do tworzenia wiązań pomiędzy grupą aldehydową cukrów redukujących, a grupą aminową białek, lipidów lub kwasów nukleinowych, co prowadzi do powstawania nieodwracalnych, stabilnych końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*ang.* AGE; *advanced glycation*

end-products) [289, 290]. AGE stanowią zróżnicowaną grupę związków, dotychczas słabo poznanych. Zjawisku glikacji często towarzyszy lipooksydacja oraz glikooksydacja, co w literaturze określane jest wspólnie jako stres karbonylowy. AGE poprzez wiązanie ze swoistym receptorem (*ang RAGE; receptor for advanced glycation end-products*) mogą aktywować makrofagi, komórki śródbłonna czy monocyty, a w następstwie prowadzić do tworzenia RFT, produkcji czynników wzrostu i pro-zapalnych cytokin oraz aktywacji czynników transkrypcyjnych [289, 290]. Zjawisko glikacji zachodzi w sposób spontaniczny oraz zależny od stężenia cukrów prostych w organizmie [289]. Wysokie stężenie endogennych AGE w organizmie zaburzą pracę komórek poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego [289, 290]. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że u pacjentów z AML nasilony jest proces glikacji (Rycina 45). Wzrost poziomu AGE w organizmie mogą powodować czynniki endogenne, tj. przewlekłe choroby nerek, hiperglikemia, nadciśnienie, zapalenie, starzenie organizmu, stres oksydacyjny oraz czynniki egzogenne, do których należy przede wszystkim dieta (bogata w tłuszcze czy AGE), palenie tytoniu i zanieczyszczenie środowiska [289, 290]. W ostatnich doniesieniach zaproponowano AGE jako potencjalny marker terapeutyczny i prognostyczny w raku piersi [291]. AGE bezpośrednio indukowały proliferację pierwotnych komórek AML oraz ludzkiej linii komórek nowotworowych HEL poprzez zaburzenia szlaków sygnalizacyjnych, tj. PI3K, MAPK oraz JAK/STAT [292]. Sugeruje się, że w różnych chorobach nowotworowych biomarkery OS mogą być wskaźnikami prognostycznymi [287]. Otrzymane wyniki dotyczące OS w krwi pacjentów z AML w porównaniu do osób zdrowych, są w głównej mierze zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi [293]. Zjawisko nadmiernej produkcji RFT w komórkach białaczkowych zostało potwierdzone, aczkolwiek jego przyczyna nie jest jednoznacznie określona [287, 293-295].

Po 24 godzinach od podania KKCz w krwi pacjentów z AML zaobserwowano wzrost poziomu OS przejawiający się, m.in. utlenianiem białek osocza. Głównym białkiem osocza krwi jest albumina, która stanowi ok. 60% całkowitej zawartości białka. W puli oznaczanych tioli osocza znakomitą większość stanowi wolna grupa –SH albuminy, dominującego białka osocza, (pochodząca od Cys-34), w porównaniu z którą zawartość małowczątkowych tioli, m.in. cysteiny, cysteinyloglicyny, glutationu, homocysteiny, czy i γ -glutamylcysteiny jest znikoma [296]. Obserwowany po przetoczeniu KKCz spadek stężenia grup tiolowych (Rycina 42) w osoczu chorych świadczy o ich utlenieniu, grupy –SH reszt cysteinyłowych albuminy i pozostałych tioli mogą być utleniane do mostków disulfidowych i/lub innych form (tj. grupy sulfenianowe, sulfonianowe, czy sulfonianowe). Utlenianie albuminy

prawdopodobnie związany jest z jej właściwościami przeciwutleniającymi [297]. W cząsteczce albuminy występującej w formie zredukowanej kluczowe znaczenie dla jej funkcji antyoksydacyjnej ma obecność wolnej grupy –SH w cysteinie (Cys-34), która uczestniczy w zmiataniu wolnych rodników [298, 299]. Kolejnymi badanymi markerami oksydacyjnych modyfikacji białek był pomiar stężenia grup karbonylowych oraz poziomu 3-nitrotyrozyny (marker stresu nitracyjnego), w których również wykazano, że przetoczenie KKCz pacjentom z AML przyczynia się do utleniania białek osocza (Rycina 43 i 44). Transfuzji KKCz towarzyszy wprowadzenie do krwioobiegu pacjenta wielu substancji biologicznie czynnych, które mogą stanowić źródło RFT i przyczyniać się do zaburzenia równowagi oksydacyjno-redukcyjnej. Związki o właściwościach utleniających mogą m. in. powodować utlenianie aminokwasów w albuminie i innych białkach osocza. Cysteina, tyrozyna, metionina, histydyna, arginina, lizyna, tryptofan oraz prolina są najbardziej wrażliwe na modyfikacje oksydacyjne [299]. Stabilnym oraz powszechnie stosowanym markerem służącym do oceny uszkodzeń oksydacyjnych jest powstawanie 3-nitrotyrozyny w białkach. Czynniki utleniające i nitrujące, tj. ONOO⁻ powstający w wyniku reakcji O₂^{•-} z NO[•], odpowiadają za tworzenie 3-NT. Nitrowanie reszt tyrozyny zaburza prawidłowe funkcjonowanie białek [300, 301]. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły związek pomiędzy przetoczeniem KKCz u pacjentów z AML, a utlenianiem białek osocza związanym ze wzrostem poziomu OS w krążeniu biorców po transfuzji. Dodatkowo, po przetoczeniu KKCz wykazano nasilenie procesu glikacji w osoczu pacjentów z AML (wzrost stężenia AGE) (Rycina 45). W badaniach własnych nie była możliwa ocena wpływu czasu przechowywania KKCz na poziom OS po przetoczeniu u pacjentów z AML ze względu na fakt, iż w grupie badanej mediana „wieku” przetaczanych jednostek KKCz wynosiła 6 dni, a tylko dwie z przetoczonych jednostek charakteryzował czas przechowywania dłuższy niż 11 dni. Warto podkreślić, iż pacjentom przetaczano jednostki NUKKCz, których termin przydatności wynosi tylko 28 dni, z tym, że napromieniowane mogą zostać jednostki nie przechowywane uprzednio dłużej niż 14 dni.

Aktualny stan wiedzy na temat badań porównujących poziom OS w różnych grupach pacjentów przed i po przetoczeniu KKCz jest raczej skromny i dotyczy pacjentów oddziałów neonatologicznych, intensywnej opieki medycznej oraz po wielokrotnych transfuzjach (tej tematyce poświęcono rozdział we wstępie teoretycznym pracy). Badania wpływu przetoczenia KKCz na oksydacyjne modyfikacje białek osocza (stężenie grup –CO) u pacjentów w stanie krytycznym z OIOM [184] są zgodne z wynikami badań własnych (Rycina 43), pomimo tego, iż Rosa i wsp. [184] pobierali krew od pacjentów tuż przed i 12 godzin po transfuzji. Brak rozbieżności wyników może wynikać z faktu, iż poziom grup

karbonylowych jest stabilnym parametrem OS. Dodatkowo, autorzy wykazali korelację pomiędzy karbonylacją białek na skutek przetoczenia KKCz, a zwiększoną śmiertelnością biorców [184]. Natomiast, w przeciwieństwie do pacjentów w stanie ciężkim [184] w badaniach własnych nie wykazano wzrostu poziomu peroksydacji lipidów u pacjentów z AML po przetoczeniu KKCz (Rycina 46). Czynnikiem wpływającym na rozbieżność wyników są przede wszystkim całkowicie inne grupy badanych pacjentów (pacjenci z OIOM *versus* AML), ale także odmienny punkt czasowy po jakim dokonywano pomiaru (12 godzin *versus* 24 godziny) oraz typ przetaczanych KKCz (nienapromieniowane, niefiltrowane *versus* napromieniowane, ubogoleukocytarne jednostki KKCz). Należy podkreślić, że charakter zmian niektórych parametrów OS po przetoczeniu KKCz może być tymczasowy, co sugerują wyniki badań przeprowadzonych w grupie wcześniaków [180] i noworodków [190]. Po 3 godzinach od przetoczenia UKKCz u wcześniaków nie obserwowano żadnych zmian w poziomach wybranych markerów OS (tj. CPA, zawartość TH i grup tiolowych), prawdopodobnie zbyt krótki czas po transfuzji uniemożliwił zaobserwowanie zmian badanych parametrów [180]. Zaś w grupie noworodków wzrost stężenia TBARS zaobserwowano po upływie 6 godzin od przetoczenia KKCz, a po 12 godzinach poziom peroksydacji lipidów był taki jak przed transfuzją [190].

Grupą najbardziej zbliżoną do pacjentów z AML, pod względem ilości wykonywanych przetoczeń jednemu biorcy, w której oceniano poziom OS po przetoczeniu KKCz mogą być biorcy wielokrotnych transfuzji. Systematyczne przetaczanie KKCz powoduje, m. in. chroniczne przeciążenie żelazem, co następnie przyczynia się do wzrostu poziomu OS, a w konsekwencji uszkodzenia tkanek i narządów . [185].

Fernandes i wsp. [188] dowiedli wzrostu stężenia grup karbonylowych białek i poziomu peroksydacji lipidów, który nie był zależny od ilości przetoczonych jednostek KKCz. Zaś obniżenie stężenia grup tiolowych obserwowano po transfuzji powyżej 10 jednostek. Co więcej, autorzy ci opisali ujemną korelację pomiędzy aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (tj. CAT, GPx, SOD), a liczbą przetoczonych jednostek KKCz [188]. Wyniki tych badań wskazują na nasilenie OS u biorców wielokrotnych transfuzji KKCz [188]. Wyniki badań własnych przeprowadzonych w grupie pacjentów z AML pozostają w zgodzie z doniesieniami innych autorów i potwierdzają wzrost OS po przetoczeniu KKCz.

Jak już wcześniej wspomniano, w literaturze brak jest doniesień opisujących zmiany parametrów OS przed i po przetoczeniu KKP. Na podstawie przeprowadzonych badań u chorych z AML wykazano wzrost poziomu TBARS (Rycina 46) i AGE (Rycina 45) po przetoczeniu KKP, co sugeruje, iż wzrost poziomu OS po transfuzji tego składnika krwi

może być związany z uszkodzeniem lipidów. Przetoczenie KKP w przeciwieństwie do KKCz nie wpływało istotnie na utlenianie białek osocza (Rycina 42, 43 i 44). AGE powstają w wyniku glikacji lipidów, białek oraz nukleotydów [289]. Analizując uzyskane wyniki przedstawiające brak modyfikacji oksydacyjnych białek, wzrost poziomu peroksydacji lipidów oraz końcowych produktów zaawansowanej glikacji można stwierdzić, iż uszkodzeniu w organizmach biorców KKP ulegają lipidy.

W Polsce, termin przydatności KKP przechowywanych w temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$ w workach tzw. „oddychających” w mieszkadle wynosi 5 dni (dzień, w którym pobrano krew pełną od dawcy to dzień 0). Płytki krwi, uzyskane z jednej jednostki krwi pełnej, mogą być zawieszane w osoczu (około 50 ml), roztworze wzbogacającym lub w mieszaninie osocza (30-40%) i płynu uzupełniającego (60-70%) [302, 303]. Roztwory wzbogacające mogą zawierać substancje, tj. chlorek sodu, magnezu i potasu, cytrynian sodu, octan sodu, fosforan sodu czy glukonian sodu [303]. Zmiany zachodzące w przechowywanych KKP są stosunkowo dobrze scharakteryzowane [304, 305]. Opisane zmiany w głównej mierze związane są z zaburzeniami aktywacji PLTs podczas przygotowywania i przechowywania KKP, co skutkuje uwalnianiem mikrocząstek płytkowych, apoptozą, zaburzeniami metabolicznymi i zmianami morfologicznymi komórek, utratą ekspresji receptorów powierzchniowych komórek, gromadzeniem czynników pro-zapalnych i immunomodulujących (tj. IL-1 α , IL-6, IL-8, sCD40L, TNF- α). Przechowywanie PLTs *ex vivo* skutkuje obniżeniem ich funkcjonalności, a co za tym idzie zmniejszoną żywotnością komórek po przetoczeniu [302, 304]. Zdolność PLTs zarówno spoczynkowych, jak i stymulowanych, do tworzenia RFT (tj. anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru) oraz RFA (reaktywne formy azotu, tj. tlenek azotu, nadtlenoazotynu, nitroksyl) w głównej mierze wynika z obecności mitochondriów w komórkach. Źródłem RFT w PLTs są także oksydaza NADPH (NOX), cyklooksygenaza-1 (COX-1), lipooksygenaza (LO), mieloperoksydaza (MPO), oksydaza ksantynowa (XO). Powszechnie wiadomo, że podczas aktywacji PLTs dochodzi do wzrostu RFT, co z kolei skutkuje występowaniem stresu oksydacyjnego [304]. W ostatnio opublikowanych badaniach, Wang i in. [306] sugerowali, iż jedną z przyczyn tak krótkiego okresu przydatności KKP (możliwość przechowywania do 5 dni) może być zachodzący w jednostkach KKP stres oksydacyjny. Poprzez dodanie antyoksydantów do KKP skutecznie opóźniono starzenie się komórek oraz zminimalizowano zachodzące zmiany wynikające z przechowywania *ex vivo* [306]. Przetoczenie KKP, podobnie jak KKCz, związane jest z dostarczeniem do krążenia biorcy wszystkich składników gromadzonych się w przechowywanych

ex vivo jednostkach, co może wpływać na powstawanie stresu oksydacyjnego w organizmach biorców. Do tej pory, u pacjentów z AML zbadano jedynie wpływ przetoczenia KKP (po godzinie i 24 godzinach) na hemostazę i uszkodzenie śródbłónka [307]. Larsen i in. [307] wykazali korzystny wpływ transfuzji KKP na hemostazę, aczkolwiek poprzetoczeniowy wzrost sCD40L powodował uszkodzenie śródbłónka. Badania własne są pierwszymi doniesieniami dotyczącymi wpływu przetoczenia KKP na parametry stresu oksydacyjnego *in vivo*.

Na skutek, m.in. zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu może dochodzić do uszkodzenia komórek, co przejawia się uwolnieniem do krwiobiegu i wzrostem aktywności LDH. Badania wykazały tendencję wzrostową aktywności LDH w osoczu krwi pacjentów z AML w porównaniu z grupą kontrolną, jak również podobną tendencję wzrostową tego markera uszkodzenia komórek wykazano po transfuzji KKCz i KKP (Rycina 50). Obserwowany trend jest zgodny z dostępnymi danymi literaturowymi, które wskazują na podwyższony poziom LDH w osoczu/surowicy pacjentów z białaczką czy nowotworami litymi, wynikający z wysokiej aktywności glikolitycznej komórek nowotworowych [308]. Przypuszcza się, iż za wzrost poziomu LDH w osoczu wymienionych grup pacjentów mogą odpowiadać również mechanizmy, tj. nekroza i uszkodzenie komórek [308]. W procesie nowotworzenia ważną rolę odgrywają zaburzone funkcje enzymów metabolicznych [309]. Zwiększone stężenie LDH we krwi powiązано ze złym rokowaniem u pacjentów z rakiem nerki, czerniakiem czy zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuc [309].

Podsumowując, wyniki badań własnych wskazują na nasilenie stresu oksydacyjnego u chorych z AML po 24 godzinach od przetoczenia KKCz (utlenianie białek osocza) i KKP (uszkodzenia lipidów). Na tym etapie badań trudno określić, czy OS jest zjawiskiem tylko przejściowym, czy też może mieć istotne znaczenie kliniczne. Z drugiej strony wiadomo, że modyfikacje białek, takie jak karbonylacja, czy nitrowanie, są nieodwracalne. Otrzymane wyniki należy interpretować z dużą ostrożnością także ze względu na stosunkowo małą liczebność grup badanych (grupa kontrolna 43 zdrowych ochotników; grupa badana 52 pacjentów, w tym 27 po przetoczeniu NUKKCz i 25 po NUKKP), chociaż wcześniejsze doniesienia literaturowe, z którymi porównywano wyniki własne, również dotyczyły grup pacjentów o raczej małej liczności, oscylujących w przedziale od 20 do 42 badanych osób.

Wyniki retrospektywnej analizy niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaistniałych w szpitalu, w którym hospitalizowani byli pacjenci, od których pobierano próbki krwi, potwierdziły zasadność wyboru pacjentów leczonych na oddziale hematologii do badań wpływu przetoczenia składników krwi na stres oksydacyjny u biorców. U pacjentów Kliniki

Hematologii najczęściej odnotowywano występowanie odczynów poprzetoczeniowych, zarówno po transfuzji KKCz, KKP, jak i FFP (Tabela 15). Na podstawie dokonanej analizy wykazano, że jedna na 811 przeprowadzonych transfuzji w WWCOiT im. M. Kopernika w Łodzi w badanym okresie kończyła się wystąpieniem odczynu poprzetoczeniowego u biorecy. Najwięcej niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych zaobserwowano po transfuzji KKCz, w szczególności KKCz bez kożuszka leukocytarno-płytkowego. Związane jest to z faktem, iż składnik ten był prawie 3-krotnie częściej przetaczany pacjentom (Tabela 11), co pozostaje w zgodzie z danymi opublikowanymi w 2018 roku w sprawozdaniu Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie [310]. Po przeanalizowaniu stosunku ilości transfuzji zakończonych odczynem poprzetoczeniowym do liczby przetoczonych jednostek wykazano, że prawdopodobieństwo wystąpienia niepożądanej reakcji było wyższe po przetoczeniu FFP (1:586) i KKP (1:666) niż KKCz (1:1 028) (Tabela 11). Na podstawie protokołów opracowania odczynu dowiedziono, iż zdecydowaną większość zidentyfikowanych reakcji stanowiły tzw. lekkie reakcje poprzetoczeniowe, tj. niehemolityczny odczyn gorączkowy (ok. 45%) oraz reakcja alergiczna (ok. 32%) (Tabela 14). Według danych opublikowanych we wspomnianym sprawozdaniu [310] w zgłoszeniach odczynów do Komisji Europejskiej (2013-2016) najczęściej występowały reakcje anafilaktyczne, hemolityczne (przetoczenie obcogrupowe) oraz TRALI.

12. Podsumowanie wyników

- Supernatanty KKCz stymulują aktywację i zwiększają reaktywność płytek krwi; jest to spowodowane wytwarzaniem RFT, których głównym źródłem jest „wolna” hemoglobina i produkty jej degradacji. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy płytkami traktowanymi supernatantem długo przechowywanych i „świeżych” oraz filtrowanych i niefiltrowanych KKCz.
- W zastosowanych warunkach doświadczalnych supernatanty KKCz, niezależnie od dnia przechowywania i leukoredukcji, zmniejszają żywotność i hamują proliferację komórek przewlekłej białaczki szpikowej (K-562) oraz linii nowotworowych (LoVo, MCF7), poprzez nasilenie w nich stresu oksydacyjnego, ale nie wykazują takiego działania wobec linii nienowotworowej (MCF-10A), co mogłoby sugerować, że nie wpływają na progresję badanych typów nowotworów. Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań.
- Supernatanty KKCz nie miały istotnego wpływu na cytotoksyczność cisplatyny wobec komórek nowotworowych.
- Przetoczenie składnika krwi (KKCz lub KKP) zwiększa stres oksydacyjny u chorych z AML, przy czym przetoczenie krwinek czerwonych prowadzi do istotnego podwyższenia markerów utleniania/nitrowania białek osocza (grup –SH i karbonylowych oraz 3-NT), natomiast po przetoczeniu płytek krwi u biorców obserwowano wzrost peroksydacji lipidów osocza.

13. Wnioski

Otrzymane w pracy doktorskiej wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- **Supernatanty KKCz zwiększają aktywację i reaktywność płytek krwi; nadreaktywność płytek krwi po przetoczeniu KKCz może być jedną z przyczyn występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych u niektórych biorców.**
- **Nie wykazano istotnego wpływu zastosowania filtrów antyleukocytarnych oraz czasu przechowywania jednostek KKCz na ich działanie pro-zakrzepowe, ani anty-proliferacyjne, co nie wskazuje na zasadność zmiany obecnie obowiązujących zaleceń dotyczących terminu ważności, czy leukoredukcji KKCz.**
- **W osoczu chorych z AML po przetoczeniu składników krwi, tj. KKCz lub KKP zwiększa się stres oksydacyjno-nitracyjny, co może mieć istotne znaczenie w przebieg kliniczny choroby i zastosowane leczenie (chemioterapię).**

14. Streszczenie

Koncentraty krwinek czerwonych (KKCz) są najczęściej przetaczanym składnikiem krwi. Podstawowym wskazaniem do ich stosowania jest zagrażająca życiu niedokrwistość, która bardzo często towarzyszy przebiegowi choroby nowotworowej. Z tego powodu pacjenci onkologiczni najczęściej leczeni są KKCz. Podczas przechowywania w środowisku *ex vivo* (42 dni w temperaturze $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ w roztworze wzbogacającym) w krwinkach czerwonych zachodzą progresywne zmiany związane z ich starzeniem i uszkodzenia oksydacyjne. Zmiany związane z przechowywaniem są szczegółowo opisane w literaturze, ale ich wpływ na częstość występowania reakcji poprzetoczeniowych nie jest dobrze poznany. Kliniczne konsekwencje przetaczania dłużej przechowywanych KKCz (z zaakceptowaną datą przydatności do 42 dni), są mało poznane i niejasne. Nadal trwa dyskusja czy przetaczanie długo przechowywanych i nie poddanych leukoredukcji jednostek KKCz jest mniej skuteczne i zwiększa ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie czy zmiany zachodzące w długo przechowywanych KKCz (w ostatnim dniu terminu przydatności) promują ich działanie pro-zakrzepowe, pro-oksydacyjne i czy mogą wzmacniać proliferację komórek nowotworowych oraz ocena wpływu filtrowania jednostek przed przechowywaniem na te procesy. Zasadniczy cel pracy realizowano poprzez trzy cele szczegółowe, które obejmowały ocenę wpływu supernatantów (z filtrowanych i niefiltrowanych KKCz, w 1. i 42. dniu przechowywania) *in vitro* na (1) parametry czynnościowe (aktywację i reaktywność) płytek krwi, (2) wybrane linie komórek nowotworowych i cytotoksyczność leku przeciwnowotworowego cisplatyny (wobec tych komórek). Badania rozszerzono o określenie wpływu przetaczania KKCz lub koncentratu płytek krwi (KKP) na poziom stresu oksydacyjnego w osoczu pacjentów z AML.

Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że supernatanty KKCz zwiększają aktywację i reaktywność płytek krwi; nadreaktywność płytek krwi po przetoczeniu KKCz może być jedną z przyczyn występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych u niektórych biorców. Nie wykazano istotnego wpływu zastosowania filtrów antyleukocytarnych oraz czasu przechowywania jednostek KKCz na ich działanie pro-zakrzepowe, ani anty-proliferacyjne, co nie wskazuje na zasadność zmiany obecnie obowiązujących w bankach krwi zaleceń dotyczących terminu ważności, czy leukoredukcji KKCz. W zastosowanych warunkach doświadczalnych nie wykazano zwiększonego wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych hodowanych w obecności supernatantów KKCz, przeciwnie wykazano, że supernatanty KKCz,

niezależnie od dnia przechowywania i leukoredukcji, zmniejszają żywotność i hamują proliferację komórek nowotworowych (linii K-562, LoVo i MCF7) poprzez nasilenie w nich stresu oksydacyjnego, ale nie wykazują takiego działania wobec linii nienowotworowej (MCF-10A) Zagadnienie to wymaga jednak dalszych badań. W osoczu chorych z AML po przetoczeniu składników krwi, tj. KKCz lub KKP zwiększa się stres oksydacyjno-nitracyny, co może mieć istotne znaczenie w przebiegu klinicznym choroby i zastosowanym leczeniu (chemioterapia).

15. Summary

Packed red blood cells (PRBCs) are the most commonly used blood component. The primary indication for their use is life-threatening anemia frequently accompanying to the tumor progression. For this reason, PRBC transfusion is most often used in cancer patient treatment. During the *ex vivo* storage (42 days at $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ in an additive solution), red blood cells undergo the progressive aging-associated changes and oxidative damage. These “storage lesion” has been well described in the literature, but their exact impact on the frequency of post-transfusion complications is not fully understood. The clinical consequences of “older” PRBC transfusion (with an expiration date of up to 42 days) are poorly recognized and unclear. It is still under discussion whether the transfusion of “older”, non-leukoreduced PRBCs is less effective than “fresher” and increases the risk of adverse post-transfusion reactions.

The general aim of the doctoral dissertation was to determine whether the “storage lesion” occurring in “older” PRBCs (on the last day of the expiration date) promote their pro-thrombotic and pro-oxidative effects and whether they can enhance the proliferation of cancer cells, as well as to assess the impact of pre-storage leukoreduction on these processes. The main goal of the study was achieved through three detailed objectives, including the assessment of the effects of the supernatants (from leukoreduced and non-leukoreduced PRBCs, at day1 and day 42) on (1) blood platelet functional parameters (activation and reactivity), (2) selected tumor cell lines and cytotoxicity of the anticancer drug cisplatin (towards these cells). The studies were extended to determine the effect of PRBC or platelet concentrate (PC) transfusion on the oxidative stress level in plasma of acute myeloid leukemia (AML) patients.

The results showed that PRBC supernatants increase platelet activation and reactivity. Platelet hypercoagulability after PRBCs transfusion may be one of the causes of thromboembolic complications in some recipients. The leukoreduction of PRBCs and storage time did not influence their pro-thrombotic or anti-proliferative effects which imply that there is no reason to change the current recommendations related to the expiration date or leukoreduction of PRBCs in blood banks. Under the experimental conditions, no increased growth and proliferation of tumor cells, cultured in the presence of PRBC supernatants, was demonstrated, on the contrary, it was shown that PRBC supernatants, regardless of the day of storage and leukoreduction, reduced the viability and inhibited the proliferation of cancer cells (K-562, LoVo and MCF7 lines) by increasing the oxidative stress. However, the PRBC

supernatants did not show such an effect on the non-tumorigenic cell line (MCF-10A). This issue requires further study. In the plasma of AML patients, oxidative-nitrative stress increases after transfusion of blood components, i.e. PRBCs or PCs, which may be crucial in the clinical course of the disease and treatment (such as chemotherapy).

16. Bibliografia

1. Garcia-Roa, M., et al., *Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives*. Blood Transfus, 2017. 15(3): p. 222-231.
2. Cancelas, J.A., et al., *Additive solution-7 reduces the red blood cell cold storage lesion*. Transfusion, 2015. 55(3): p. 491-8.
3. Iqbal, N., et al., *Red blood cell transfusion and outcome in cancer*. Transfus Apher Sci, 2017. 56(3): p. 287-290.
4. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2008 roku*. J Transfus Med, 2009. 2(4): p. 243–252.
5. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2009 roku*. J Transfus Med, 2010. 3(4): p. 133–143.
6. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2010 roku*. J Transfus Med, 2011. 4(4): p. 166–177.
7. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2011 roku*. J Transfus Med, 2012. 5(5): p. 159–170.
8. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2012 roku*. J Transfus Med, 2013. 6(4): p. 119–132.
9. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2013 roku*. J Transfus Med, 2014. 7(4): p. 111–124.
10. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2014 roku*. J Transfus Med, 2015. 8(4): p. 119–132.
11. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2015 roku*. J Transfus Med, 2016. 9(4): p. 107–124.
12. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2016 roku*. J Transfus Med, 2017. 10(4): p. 113–129.
13. Rosiek, A., et al., *Działalność jednostek organizacyjnych służby krwi w Polsce w 2017 roku*. J Transfus Med, 2018. 11(4): p. 113–130.
14. Rosiek, A., et al., *Blood transfusion service in Poland in 2018*. J Transfus Med, 2019. 12(4): p. 144-159.
15. Remy, K.E., et al., *Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation*. Transfusion, 2018. 58(3): p. 804-815.
16. Wannez, A., et al., *Extracellular Vesicles in Red Blood Cell Concentrates: An Overview*. Transfus Med Rev, 2019. 33(2): p. 125-130.
17. Zimring, J.C., *Fresh versus old blood: are there differences and do they matter?* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. 1: p. 651–655.
18. Carson, J.L., et al., *Clinical Practice Guidelines From the AABB: Red Blood Cell Transfusion Thresholds and Storage*. JAMA, 2016. 316(19): p. 2025-2035.
19. Radziwon, P., et al., *Anaemia in cancer patients — Expert Group recommendations*. Oncol Clin Pract 2017. 13(5): p. 202–210.
20. Westerman, M. and J.B. Porter, *Red blood cell-derived microparticles: An overview*. Blood Cells, Molecules and Diseases, 2016. 59: p. 134–139.
21. Hess, J.R., *Measures of stored red blood cell quality*. Vox Sang, 2014. 107(1): p. 1-9.
22. Spinella, P.C., et al., *Duration of red blood cell storage is associated with increased incidence of deep vein thrombosis and in hospital mortality in patients with traumatic injuries*. Crit Care, 2009. 13(5): p. R151.
23. Lee, H.K., et al., *Effect of perioperative transfusion of old red blood cells on postoperative complications after free muscle sparing transverse rectus abdominis*

- myocutaneous flap surgery for breast reconstruction. Microsurgery, 2014. 34(6): p. 434-8.*
24. Koch, C.G., et al., *Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. N Engl J Med, 2008. 358(12): p. 1229-39.*
 25. Wang, D., et al., *Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. Transfusion, 2012. 52(6): p. 1184-95.*
 26. Halmin, M., et al., *Length of Storage of Red Blood Cells and Patient Survival After Blood Transfusion: A Binational Cohort Study. Ann Intern Med, 2017. 166(4): p. 248-256.*
 27. Lelubre, C., M. Piagnerelli, and J.L. Vincent, *Association between duration of storage of transfused red blood cells and morbidity and mortality in adult patients: myth or reality? Transfusion, 2009. 49(7): p. 1384-94.*
 28. Dhabangi, A., et al., *Effect of Transfusion of Red Blood Cells With Longer vs Shorter Storage Duration on Elevated Blood Lactate Levels in Children With Severe Anemia: The TOTAL Randomized Clinical Trial. JAMA, 2015. 314(23): p. 2514-23.*
 29. Lacroix, J., et al., *The Age of Blood Evaluation (ABLE) randomized controlled trial: study design. Transfus Med Rev, 2011. 25(3): p. 197-205.*
 30. Fergusson, D.A., et al., *Effect of fresh red blood cell transfusions on clinical outcomes in premature, very low-birth-weight infants: the ARIPI randomized trial. JAMA, 2012. 308(14): p. 1443-51.*
 31. Zallen, G., et al., *Stored red blood cells selectively activate human neutrophils to release IL-8 and secretory PLA2. Shock, 2000. 13(1): p. 29-33.*
 32. Weinberg, J.A., et al., *Age of transfused blood: an independent predictor of mortality despite universal leukoreduction. J Trauma, 2008. 65(2): p. 279-82; discussion 282-4.*
 33. Dumont, L.J. and J.P. AuBuchon, *Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. Transfusion, 2008. 48(6): p. 1053-60.*
 34. Tzounakas, V.L., et al., *Red blood cell transfusion in surgical cancer patients: Targets, risks, mechanistic understanding and further therapeutic opportunities. Transfus Apher Sci, 2017. 56(3): p. 291-304.*
 35. Silliman, C.C., T. Burke, and M.R. Kelher, *The accumulation of lipids and proteins during red blood cell storage: the roles of leucoreduction and experimental filtration. Blood Transfus, 2017. 15(2): p. 131-136.*
 36. D'Alessandro, A., et al., *An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. Transfusion, 2015. 55(1): p. 205-19.*
 37. Obrador, R., S. Musulin, and B. Hansen, *Red blood cell storage lesion. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2015. 25(2): p. 187-99.*
 38. Sut, C., et al., *Duration of red blood cell storage and inflammatory marker generation. Blood Transfus, 2017. 15(2): p. 145-152.*
 39. Koch, C.G., et al., *Real Age: Red Blood Cell Aging During Storage. Ann Thorac Surg, 2019. 107(3): p. 973-980.*
 40. Chang, A., et al., *Cryopreserved packed red blood cells in surgical patients: past, present, and future. Blood Transfus, 2017. 15(4): p. 341-347.*
 41. Zimring, J.C., *Established and theoretical factors to consider in assessing the red cell storage lesion. Blood, 2015. 125(14): p. 2185-90.*
 42. Bakkour, S., et al., *Manufacturing method affects mitochondrial DNA release and extracellular vesicle composition in stored red blood cells. Vox Sang, 2016. 111(1): p. 22-32.*

43. Almizraq, R.J., J. Seghatchian, and J.P. Acker, *Extracellular vesicles in transfusion-related immunomodulation and the role of blood component manufacturing*. *Transfus Apher Sci*, 2016. 55(3): p. 281-291.
44. Fu, X., et al., *Bioactive lipids accumulate in stored red blood cells despite leukoreduction: a targeted metabolomics study*. *Transfusion*, 2016. 56(10): p. 2560-2570.
45. Tzounakas, V.L., et al., *Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges*. *Proteomics Clin Appl*, 2016. 10(8): p. 791-804.
46. Weisel, J.W. and R.I. Litvinov, *Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2019. 17(2): p. 271-282.
47. Tzounakas, V.L., et al., *Unraveling the Gordian knot: red blood cell storage lesion and transfusion outcomes*. *Blood Transfus*, 2017. 15(2): p. 126-130.
48. D'Alessandro, A., et al., *Supernatant protein biomarkers of red blood cell storage hemolysis as determined through an absolute quantification proteomics technology*. *Transfusion*, 2016. 56(6): p. 1329-39.
49. Martí-Carvajal, A.J., D. Simancas-Racines, and B.S. Peña-González, *Prolonged storage of packed red blood cells for blood transfusion*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015(7): p. Cd009330.
50. Sun, K., A. D'Alessandro, and Y. Xiao, *Purinergic control of red blood cell metabolism: novel strategies to improve red cell storage quality*. *Blood Transfus* 2017. 15: p. 535-542
51. Antonelou, M.H. and J. Seghatchian, *Update on extracellular vesicles inside red blood cell storage units: Adjust the sails closer to the new wind*. *Transfus Apher Sci*, 2016. 55(1): p. 92-104.
52. D'Alessandro, A., J.C. Zimring, and M. Busch, *Chronological storage age and metabolic age of stored red blood cells: are they the same?* *Transfusion*, 2019. 59(5): p. 1620-1623.
53. D'Alessandro, A. and J. Seghatchian, *Hitchhiker's guide to the red cell storage galaxy: Omics technologies and the quality issue*. *Transfus Apher Sci*, 2017. 56(2): p. 248-253.
54. van 't Erve, T.J., et al., *Heritability of glutathione and related metabolites in stored red blood cells*. *Free Radic Biol Med*, 2014. 76: p. 107-13.
55. Van 't Erve, T.J., et al., *The heritability of hemolysis in stored human red blood cells*. *Transfusion*, 2015. 55(6): p. 1178-85.
56. Bawazir, W.M., et al., *Familial pseudohyperkalemia in blood donors: a novel mutation with implications for transfusion practice*. *Transfusion*, 2014. 54(12): p. 3043-50.
57. Klein, H., C. Natanson, and W. Flegel, *Transfusion of fresh vs. older red blood cells in the context of infection*. *ISBT Sci Ser*, 2015. 10(Suppl 1): p. 275-285.
58. Sengupta, P., et al., *Nitric oxide donors offer protection to RBC from storage lesion*. *Transfus Clin Biol*, 2020.
59. Kriebardis, A.G., et al., *RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components*. *Transfusion*, 2008. 48(9): p. 1943-53.
60. Hess, J.R., et al., *Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions*. *Transfusion*, 2009. 49(12): p. 2599-603.
61. Hod, E.A. and S.L. Spitalnik, *Harmful effects of transfusion of older stored red blood cells: iron and inflammation*. *Transfusion*, 2011. 51(4): p. 881-5.
62. Sparrow, R.L., *Red blood cell storage duration and trauma*. *Transfus Med Rev*, 2015. 29(2): p. 120-6.

63. Spinelli, S.L., et al., *Isoprostane and isofuran lipid mediators accumulate in stored red blood cells and influence platelet function in vitro*. *Transfusion*, 2014. 54(6): p. 1569-1579.
64. Annis, A.M., et al., *Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products*. *Transfusion*, 2005. 45(9): p. 1426-33.
65. Grimshaw, K., et al., *New frontiers in transfusion biology: identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells*. *Transfusion*, 2011. 51(4): p. 874-880.
66. Vlaar, A.P., et al., *Supernatant of aged erythrocytes causes lung inflammation and coagulopathy in a "two-hit" in vivo syngeneic transfusion model*. *Anesthesiology*, 2010. 113(1): p. 92-103.
67. Sweeney, J., N. Kouttab, and J. Kurtis, *Stored red blood cell supernatant facilitates thrombin generation*. *Transfusion*, 2009. 49(8): p. 1569-79.
68. Rubin, O., et al., *Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation*. *Transfusion*, 2013. 53(8): p. 1744-54.
69. Gao, Y., et al., *Elevated levels of thrombin-generating microparticles in stored red blood cells*. *Vox Sang*, 2013. 105(1): p. 11-7.
70. Zecher, D., A. Cumpelik, and J.A. Schifferli, *Erythrocyte-derived microvesicles amplify systemic inflammation by thrombin-dependent activation of complement*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(2): p. 313-20.
71. Kono, M., et al., *Heme-related molecules induce rapid production of neutrophil extracellular traps*. *Transfusion*, 2014. 54(11): p. 2811-9.
72. Danesh, A., et al., *Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro*. *Blood*, 2014. 123(5): p. 687-96.
73. Donadee, C., et al., *Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion*. *Circulation*, 2011. 124(4): p. 465-76.
74. Sadallah, S., C. Eken, and J.A. Schifferli, *Erythrocyte-derived ectosomes have immunosuppressive properties*. *J Leukoc Biol*, 2008. 84(5): p. 1316-25.
75. Cardo, L.J., D. Wilder, and J. Salata, *Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection*. *Transfus Apher Sci*, 2008. 38(2): p. 117-25.
76. Lu, C., et al., *Procoagulant activity of long-term stored red blood cells due to phosphatidylserine exposure*. *Transfus Med*, 2011. 21(3): p. 150-7.
77. Keating, F.K., et al., *Platelet-white blood cell (WBC) interaction, WBC apoptosis, and procoagulant activity in stored red blood cells*. *Transfusion*, 2011. 51(5): p. 1086-95.
78. Vamvakas, E.C. and M.A. Blajchman, *Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update*. *Blood Rev*, 2007. 21(6): p. 327-48.
79. Silliman, C.C., et al., *Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury*. *Transfusion*, 2011. 51(12): p. 2549-54.
80. Sparrow, R.L. and K.A. Patton, *Supernatant from stored red blood cell primes inflammatory cells: influence of prestorage white cell reduction*. *Transfusion*, 2004. 44(5): p. 722-30.
81. Liu, C., et al., *Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells*. *Redox Biol*, 2014. 2: p. 211-9.
82. Hod, E.A. and S.L. Spitalnik, *Stored red blood cell transfusions: Iron, inflammation, immunity, and infection*. *Transfus Clin Biol*, 2012. 19(3): p. 84-9.

83. Hod, E.A., et al., *Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation*. *Blood*, 2010. 115(21): p. 4284-92.
84. Gultawatvichai, P., et al., *Hemolysis in In-Date RBC Concentrates*. *Am J Clin Pathol*, 2017. 149(1): p. 35-41.
85. Carson, J.L., D.J. Triulzi, and P.M. Ness, *Indications for and Adverse Effects of Red-Cell Transfusion*. *N Engl J Med*, 2017. 377(13): p. 1261-1272.
86. Dubovoy, T. and M. Engoren, *Thrombotic Risks in Red Blood Cell Transfusions*. *Semin Thromb Hemost*, 2016. 42(2): p. 102-11.
87. Antonelou, M.H. and J. Seghatchian, *Insights into red blood cell storage lesion: Toward a new appreciation*. *Transfus Apher Sci*, 2016. 55(3): p. 292-301.
88. Goel, R., et al., *Red blood cells stored 35 days or more are associated with adverse outcomes in high-risk patients*. *Transfusion*, 2016. 56(7): p. 1690-8.
89. Cubedo, J., et al., *Erythrocyte-heme proteins and STEMI: implications in prognosis*. *Thromb Haemost*, 2017. 117(10): p. 1970-1980.
90. Baron, D.M., C. Lei, and L. Berra, *Old, older, the oldest: red blood cell storage and the potential harm of using older red blood cell concentrates*. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2020. 33(2): p. 234-239.
91. Spieth, P.M. and H. Zhang, *Storage injury and blood transfusions in trauma patients*. *Curr Opin Anesthesiol* 31.
92. Hoehn, R.S., et al., *Molecular mechanisms of erythrocyte aging*. *Biol Chem*, 2015. 396(6-7): p. 621-31.
93. Tran, P.L., et al., *Hemolysate-mediated platelet aggregation: an additional risk mechanism contributing to thrombosis of continuous flow ventricular assist devices*. *Perfusion*, 2016. 31(5): p. 401-8.
94. Rother, R.P., et al., *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease*. *Jama*, 2005. 293(13): p. 1653-62.
95. Schmidt, H. and M. Feelisch, *Red Blood Cell-Derived Nitric Oxide Bioactivity and Hypoxic Vasodilation*. *Circulation*, 2019. 139(23): p. 2664-2667.
96. Sun, C.W., et al., *Hemoglobin β 93 Cysteine Is Not Required for Export of Nitric Oxide Bioactivity From the Red Blood Cell*. *Circulation*, 2019. 139(23): p. 2654-2663.
97. Camus, S.M., et al., *Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease*. *Blood*, 2015. 125(24): p. 3805-14.
98. Rapido, F., et al., *Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis*. *J Clin Invest*, 2017. 127(1): p. 375-382.
99. Słomka, A., W. Włodarczyk, and E. Żekanowska, *Udział żelaza niezwiązanego z transferyną w patofizjologii chorób człowieka*. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie*, 2011. 1: p. 101-107.
100. Hod, E.A., R.O. Francis, and S.L. Spitalnik, *Red Blood Cell Storage Lesion-Induced Adverse Effects: More Smoke; Is There Fire?* *Anesth Analg*, 2017. 124(6): p. 1752-1754.
101. Straat, M., et al., *Extracellular Vesicles from Red Blood Cell Products Induce a Strong Pro-Inflammatory Host Response, Dependent on Both Numbers and Storage Duration*. *Transfus Med Hemother*, 2016. 43(4): p. 302-305.
102. van der Pol, E., et al., *Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles*. *J Thromb Haemost*, 2016. 14(1): p. 48-56.

103. Owens, A.P., 3rd and N. Mackman, *Microparticles in hemostasis and thrombosis*. *Circ Res*, 2011. 108(10): p. 1284-97.
104. Sparrow, R.L., et al., *In vitro measures of membrane changes reveal differences between red blood cells stored in saline-adenine-glucose-mannitol and AS-1 additive solutions: a paired study*. *Transfusion*, 2014. 54(3): p. 560-8.
105. Almizraq, R., et al., *Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality*. *Transfusion*, 2013. 53(10): p. 2258-67.
106. Aung, H.H., et al., *Procoagulant role of microparticles in routine storage of packed red blood cells: potential risk for prothrombotic post-transfusion complications*. *Pathology*, 2016. 49(1): p. 62-69.
107. Jy, W., et al., *Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications*. *Transfusion*, 2011. 51(4): p. 886-93.
108. Straat, M., et al., *Monocyte-mediated activation of endothelial cells occurs only after binding to extracellular vesicles from red blood cell products, a process mediated by beta-integrin*. *Transfusion*, 2016. 56(12): p. 3012-3020.
109. Molnar, L., et al., *Cerebral autoregulation testing in a porcine model of intravenously administered E. coli induced fulminant sepsis*. *Critical Care*, 2015. 19(Suppl 1).
110. Pulliam, K.E., et al., *Innate coagulability changes with age in stored packed red blood cells*. *Thromb Res*, 2020. 195: p. 35-42.
111. Devalet, B., et al., *Application of a clot-based assay to measure the procoagulant activity of stored allogeneic red blood cell concentrates*. *Blood Transfus*, 2018. 16(2): p. 163-172.
112. Fischer, D., et al., *Microparticles from stored red blood cells enhance procoagulant and proinflammatory activity*. *Transfusion*, 2017. 57(11): p. 2701-2711.
113. Aleshnick, M., et al., *Procoagulant activity in stored units of red blood cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 474(4): p. 680-685.
114. Kim, Y., et al., *Microparticles from aged packed red blood cell units stimulate pulmonary microthrombus formation via P-selectin*. *Thromb Res*, 2020. 185: p. 160-166.
115. Van Der Meijden, P.E.J., et al., *Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2012. 10(7): p. 1355-1362.
116. Bouchard, B.A., et al., *Microparticles formed during storage of red blood cell units support thrombin generation*. *J Trauma Acute Care Surg*, 2018. 84(4): p. 598-605.
117. Tripisciano, C., et al., *Extracellular Vesicles Derived From Platelets, Red Blood Cells, and Monocyte-Like Cells Differ Regarding Their Ability to Induce Factor XII-Dependent Thrombin Generation*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. 8: p. 298.
118. Noubouossie, D.F., et al., *Red blood cell microvesicles activate the contact system, leading to factor IX activation via 2 independent pathways*. *Blood*, 2020. 135(10): p. 755-765.
119. Stavrou, E.X., *Thromboinflammatory effects of RBC microvesicles*. *Blood*, 2020. 135(10): p. 708-709.
120. Kristiansson, M., et al., *Cytokines in stored red blood cell concentrates: promoters of systemic inflammation and simulators of acute transfusion reactions? Acta Anaesthesiol Scand*, 1996. 40(4): p. 496-501.
121. Burnouf, T., et al., *An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful? Transfus Apher Sci*, 2015. 53(2): p. 137-45.
122. Shukla, R., T. Patel, and S. Gupte, *Release of cytokines in stored whole blood and red cell concentrate: Effect of leukoreduction*. *Asian J Transfus Sci*, 2015. 9(2): p. 145-9.

123. Benson, D.D., et al., *Accumulation of Pro-Cancer Cytokines in the Plasma Fraction of Stored Packed Red Cells*. Journal of Gastrointestinal Surgery, 2012. 16(3): p. 460-468.
124. Kor, D.J., C.M. Van Buskirk, and O. Gajic, *Red blood cell storage lesion*. Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences, 2009. 9: p. S21-S27.
125. Chang, C.C., et al., *Transfusion-associated adverse reactions (TAARs) and cytokine accumulations in the stored blood components: the impact of prestorage versus poststorage leukoreduction*. Oncotarget, 2018. 9(4): p. 4385-4394.
126. Silliman, C.C., et al., *Supernatants and lipids from stored red blood cells activate pulmonary microvascular endothelium through the BLT2 receptor and protein kinase C activation*. Transfusion, 2017. 57(11): p. 2690-2700.
127. Yoshimoto, T. and Y. Takahashi, *Arachidonate 12-lipoxygenases*. Prostaglandins & other Lipid Mediators, 2002. 68–69: p. 245–262.
128. Porro, B., et al., *Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014. 964: p. 26-40.
129. Calder, P.C., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?* Br J Clin Pharmacol, 2013. 75(3): p. 645-62.
130. Brash, A.R., *Arachidonic acid as a bioactive molecule*. The Journal of Clinical Investigation, 2001. 107(11): p. 1339-1345.
131. Dzieciatkowska, M., et al., *Proteomic analysis of the supernatant of red blood cell units: the effects of storage and leucoreduction*. Vox Sang, 2013. 105(3): p. 210-8.
132. D'Alessandro, A., et al., *Omics markers of the red cell storage lesion and metabolic linkage*. Blood Transfus, 2017. 15(2): p. 137-144.
133. Maitta, R.W., *Transfusion-Related Immunomodulation*, in *Immunologic Concepts in Transfusion Medicine*. 2020. p. 81-95.
134. Walsh, T.S., et al., *The Age of BLOOD Evaluation (ABLE) randomised controlled trial: description of the UK-funded arm of the international trial, the UK cost-utility analysis and secondary analyses exploring factors associated with health-related quality of life and health-care costs during the 12-month follow-up*. Health Technol Assess, 2017. 21(62): p. 1-118.
135. Steiner, M.E., et al., *Effects of red-cell storage duration on patients undergoing cardiac surgery*. N Engl J Med, 2015. 372(15): p. 1419-29.
136. Tucci, M., et al., *The age of blood in pediatric intensive care units (ABC PICU): study protocol for a randomized controlled trial*. Trials, 2018. 19(1): p. 404.
137. Cook, R.J., et al., *Red blood cell storage and in-hospital mortality: a secondary analysis of the INFORM randomised controlled trial*. The Lancet Haematology, 2017. 4(11): p. e544-e552.
138. Lacroix, J., et al., *Age of transfused blood in critically ill adults*. N Engl J Med, 2015. 372(15): p. 1410-8.
139. Cooper, D.J., et al., *Age of Red Cells for Transfusion and Outcomes in Critically Ill Adults*. N Engl J Med, 2017. 377(19): p. 1858-1867.
140. Majdan, A., *Erytropoetyna w leczeniu niedokrwistości w przebiegu nowotworów złośliwych – czy ewentualne korzyści przewyższają ryzyko?* Oncology and Radiotherapy, 2017. 3(41): p. 053-061.
141. Chełstowska, M. and K. Warzocha, *Objawy kliniczne i zmiany laboratoryjne w diagnostyce różnicowej niedokrwistości*. Onkologia W Praktyce Klinicznej, 2006. 2(3): p. 105-116.
142. Gilreath, J.A. and G.M. Rodgers, *How I treat Cancer Anemia*. Blood, 2020. 136(7): p. 1-33.

143. Weiss, G., T. Ganz, and L.T. Goodnough, *Anemia of inflammation*. *Blood*, 2019. 133(1): p. 40-50.
144. Goubran, H.A., et al., *Impact of Transfusion on Cancer Growth and Outcome*. *Cancer Growth and Metastasis*, 2016. 9.
145. Rodgers, G.M. and J.A. Gilreath, *The Role of Intravenous Iron in the Treatment of Anemia Associated with Cancer and Chemotherapy*. *Acta Haematol*, 2019. 142(1): p. 13-20.
146. Bohlius, J., et al., *Management of cancer-associated anemia with erythropoiesis-stimulating agents: ASCO/ASH clinical practice guideline update*. *Blood Adv*, 2019. 3(8): p. 1197-1210.
147. Khorana, A.A., et al., *Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer*. *Arch Intern Med*, 2008. 168(21): p. 2377-81.
148. Lee, J., et al., *Association between red blood cell transfusion and long-term mortality in patients with cancer of the esophagus after esophagectomy*. *Dis Esophagus*, 2018. 31(2).
149. Atzil, S., et al., *Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes*. *Anesthesiology*, 2008. 109(6): p. 989-97.
150. Hunsicker, O., et al., *Transfusion of red blood cells does not impact progression-free and overall survival after surgery for ovarian cancer*. *Transfusion*, 2019. 59(12): p. 3589-3600.
151. Ananth, A.A., et al., *Surgical Stress Abrogates Pre-Existing Protective T Cell Mediated Anti-Tumor Immunity Leading to Postoperative Cancer Recurrence*. *PLOS ONE*, 2016. 11(5): p. e0155947.
152. Gao, J., et al., *Failure recovery of circulating NKG2D(+)CD56(dim)NK cells in HBV-associated hepatocellular carcinoma after hepatectomy predicts early recurrence*. *Oncoimmunology*, 2016. 5(1): p. e1048061.
153. Agudelo-Jimenez, R.D., J.A. Heatter, and J.P. Cata, *Transfusion Therapy: Is There a Link with Cancer Recurrence?* *Curr Anesthesiol Rep*, 2018. 8(4): p. 426-438.
154. Tartter, P.I., *Blood transfusion and infectious complications following colorectal cancer surgery*. *Br J Surg*, 1988. 75(8): p. 789-792.
155. Heiss, M.M., et al., *Blood transfusion-modulated tumor recurrence: first results of a randomized study of autologous versus allogeneic blood transfusion in colorectal cancer surgery*. *J Clin Oncol*, 1994. 12(9): p. 1859-67.
156. Houbiers, J.G., et al., *Randomised controlled trial comparing transfusion of leucocyte-depleted or buffy-coat-depleted blood in surgery for colorectal cancer*. *Lancet*, 1994. 344(8922): p. 573-8.
157. Cata, J.P., et al., *Association between Perioperative Blood Transfusions and Clinical Outcomes in Patients Undergoing Bladder Cancer Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis Study*. *J Blood Transfus*, 2016. 2016: p. 9876394.
158. Li, S.L., Y. Ye, and X.H. Yuan, *Association between Allogeneic or Autologous Blood Transfusion and Survival in Patients after Radical Prostatectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2017. 12(1): p. e0171081.
159. Sun, C., et al., *Allogeneic blood transfusion and the prognosis of gastric cancer patients: systematic review and meta-analysis*. *Int J Surg*, 2015. 13: p. 102-110.
160. Wang, Y.L., et al., *Perioperative Blood Transfusion Promotes Worse Outcomes of Bladder Cancer after Radical Cystectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0130122.
161. Deeb, A.P., et al., *Allogeneic Leukocyte-Reduced Red Blood Cell Transfusion Is Associated with Postoperative Infectious Complications and Cancer Recurrence after Colon Cancer Resection*. *Digestive Surgery*, 2020. 37(2): p. 163-170.

162. Goubran, H., et al., *Transfusion-related immunomodulation and cancer*. Transfusion and Apheresis Science, 2017. 56(3): p. 336-340.
163. Dickson, E.A. and A.G. Acheson, *Allogeneic blood and postoperative cancer outcomes: correlation or causation?* Anaesthesia, 2020. 75(4): p. 438-441.
164. Berraondo, P., et al., *Cytokines in clinical cancer immunotherapy*. Br J Cancer, 2019. 120(1): p. 6-15.
165. Jones, V.S., et al., *Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies*. Biochim Biophys Acta, 2016. 1865(2): p. 255-65.
166. Chechlińska, M., *Rola cytokin w procesach nowotworzenia*. NOWOTWORY Journal of Oncology, 2003. 53(6): p. 648-659.
167. Fernandes, J.V., et al., *The role of the mediators of inflammation in cancer development*. Pathol Oncol Res, 2015. 21(3): p. 527-34.
168. Shrihari, T.G., *Dual role of inflammatory mediators in cancer*. Ecancermedicallscience, 2017. 11: p. 721.
169. Cata, J.P., et al., *Inflammatory response, immunosuppression, and cancer recurrence after perioperative blood transfusions*. Br J Anaesth, 2013. 110(5): p. 690-701.
170. Remy, K.E., C. Natanson, and H.G. Klein, *The influence of the storage lesion(s) on pediatric red cell transfusion*. Curr Opin Pediatr, 2015. 27(3): p. 277-85.
171. Karsten, E., E. Breen, and B.R. Herbert, *Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 3101.
172. Shukla, R., T. Patel, and S. Gupte, *Release of cytokines in stored whole blood and red cell concentrate: Effect of leukoreduction*. Asian J Transfus Sci, 2015. 9(2): p. 145-149.
173. Lo, K.K., et al., *Hemoglobin-based oxygen carrier mitigates transfusion-mediated pancreas cancer progression*. Ann Surg Oncol, 2013. 20(6): p. 2073-7.
174. Sut, C., et al., *Properties of donated red blood cell components from patients with hereditary hemochromatosis*. Transfusion, 2017. 57(1): p. 166-177.
175. Chakraborty, C., et al., *The Interplay among miRNAs, Major Cytokines, and Cancer-Related Inflammation*. Mol Ther Nucleic Acids, 2020. 20: p. 606-620.
176. Velasquez, J.F. and J.P. Cata, *Transfusions of blood products and cancer outcomes*. Rev Esp Anestesiología Reanim, 2015. 62(8): p. 461-7.
177. Youssef, L.A. and S.L. Spitalnik, *Transfusion-related immunomodulation: a reappraisal*. Curr Opin Hematol, 2017. 24(6): p. 551-557.
178. Pawłowska, M., et al., *Ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego u chorych na łuszczycę*. Diagn Lab, 2016. 52(2): p. 101-106.
179. Zhang, H. and R. Tsao, *Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects*. Curr Opin Food Sci, 2016. 8: p. 33-42.
180. Dani, C., et al., *Effect of blood transfusions on oxidative stress in preterm infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004. 89(5): p. F408-11.
181. Hirano, K., et al., *Blood transfusion increases radical promoting non-transferrin bound iron in preterm infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2001. 84(3): p. F188-93.
182. Wardle, S.P., et al., *Effect of blood transfusion on lipid peroxidation in preterm infants*. Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition, 2002. 86(1): p. F46-F48.
183. Collard, K.J., S. Godeck, and J.E. Holley, *Blood transfusion and pulmonary lipid peroxidation in ventilated premature babies*. Pediatr Pulmonol, 2005. 39(3): p. 257-61.
184. Rosa, S.D., et al., *Effect of red blood cell transfusion on parameters of inflammation and oxidative stress in critically ill patients*. Rev Bras Ter Intensiva, 2011. 23(1): p. 30-5.
185. Chattopadhyay, R., et al., *Assessment Of Oxidative Stress In Recipients Of Chronic Transfusion Therapy*. Gomal J Med Sci, 2013. 11(1): p. 105-109.

186. Walter, P.B., et al., *Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease*. Br J Haematol, 2006. 135(2): p. 254-263.
187. Sengsuk, C., et al., *Association of Iron Overload with Oxidative Stress, Hepatic Damage and Dyslipidemia in Transfusion-Dependent beta-Thalassemia/HbE Patients*. Indian J Clin Biochem, 2014. 29(3): p. 298-305.
188. Fernandes, M.S., et al., *Oxidative stress and labile plasmatic iron in anemic patients following blood therapy*. World J Exp Med, 2014. 4(3): p. 38-45.
189. Nagababu, E., et al., *Oxidative stress and rheologic properties of stored red blood cells before and after transfusion to surgical patients*. Transfusion, 2016. 56(5): p. 1101-1111.
190. Kokk, T., et al., *Markers of oxidative stress before and after exchange transfusion for neonatal sepsis*. Acta Paediatr, 1996. 85(10): p. 1244-1246.
191. Bagheri, F., et al., *The effect of exchange transfusion on prooxidant-antioxidant balance in newborns Jaundice*. Biomed Res Ther, 2018. 5(3): p. 2119-2129.
192. Nagababu, E., et al., *Oxidative stress and rheologic properties of stored red blood cells before and after transfusion to surgical patients*. Transfusion, 2016. 56(5): p. 1101-1111.
193. Westerman, M., et al., *Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy*. Br J Haematol, 2008. 142(1): p. 126-35.
194. Drabkin D.L., A.J.H., *Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin*. J Biol Chem, 1935(122): p. 51-65.
195. Janatpour, K., et al., *Comparison of X-ray vs. gamma irradiation of CPDA-1 red cells*. Vox Sang, 2005. 89(4): p. 215-9.
196. Erel, O., *A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation*. Clin Biochem, 2004. 37(4): p. 277-85.
197. Bartosz, G. and M. Bartosz, *Antioxidant activity: what do we measure?* Acta Biochim Pol, 1999. 46(1): p. 23-9.
198. Maślanka, K., *Fizjologiczna i patogenna aktywność mikrocząstek błon komórkowych*. J Transfus Med, 2010. 3: p. 9-17.
199. Canellini, G., et al., *Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry*. Blood Transfus, 2012. 10 Suppl 2: p. s39-45.
200. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
201. Nowak, P., et al., *Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences*. Thromb Res, 2007. 121(2): p. 163-74.
202. Tuszynski, G.P. and A. Murphy, *Spectrophotometric quantitation of anchorage-dependent cell numbers using the bicinchoninic acid protein assay reagent*. Anal Biochem, 1990. 184(1): p. 189-91.
203. Walkowiak, B., et al., *Rapid photometric method for estimation of platelet count in blood plasma or platelet suspension*. Thromb Res, 1989. 56(6): p. 763-6.
204. Saluk-Juszczak, J., et al., *Effects of the extract from Conyza canadensis on human blood platelet aggregation*. Gen Physiol Biophys, 2007. 26(2): p. 150-2.
205. Morel, A., et al., *Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients*. Mol Cell Biochem, 2017. 430(1-2): p. 69-80.
206. Balcerczyk, A., et al., *Induction of apoptosis and modulation of production of reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyliodonium*. Biochem Pharmacol, 2005. 69(8): p. 1263-73.

207. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. 175(1): p. 184-91.
208. Klaude, M., et al., *The comet assay: mechanisms and technical considerations*. Mutat Res, 1996. 363(2): p. 89-96.
209. Czubaszek M, S.M., Wójcik E, Andraszek K, *Test kometowy jako metoda identyfikacji niestabilności chromosomów*. Postepy Hig Med Dosw, 2014. 68: p. 695-700.
210. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys, 1959. 82(1): p. 70-7.
211. Rice-Evans C., D.A., Symons M., *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, New York, 1991: p. 207-235.
212. Alamdari, D.H., et al., *High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. 39(10): p. 1362-1367.
213. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol, 1990. 186: p. 464-78.
214. Buss, H., et al., *Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method*. Free Radic Biol Med, 1997. 23(3): p. 361-6.
215. Khan, J., et al., *3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method*. Biochem J, 1998. 330 (Pt 2): p. 795-801.
216. Ischiropoulos, H. and A.B. al-Mehdi, *Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications*. FEBS Lett, 1995. 364(3): p. 279-82.
217. Thornalley, P.J., *Endogenous alpha-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycation endproducts in tissue damage*. Novartis Found Symp, 2007. 285: p. 229-43; discussion 243-6.
218. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. 249(22): p. 7130-9.
219. Wroblewski, F. and J.S. Ladue, *Lactic dehydrogenase activity in blood*. Proc Soc Exp Biol Med, 1955. 90(1): p. 210-3.
220. Gondko R., Z.A., Adamska M., *Biostatystyka w zadaniach*. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 2001.
221. Watała, C., *Biostatystyka - wykorzystanie metod statystycznych w pracy badawczej w naukach biomedycznych*. Alfa Medica Press, 2002.
222. Rinalducci, S., et al., *Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions*. Transfusion, 2011. 51(7): p. 1439-49.
223. *Wytyczne w zakresie leczenia krwią i jej składnikami oraz produktami krwiopochodnymi w podmiotach leczniczych internet aktywny spis treści*. 2014.
224. Yoshida, T., M. Prudent, and A. D'Alessandro, *Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences*. Blood Transfus, 2019. 17(1): p. 27-52.
225. Goel, R., et al., *Association of Perioperative Red Blood Cell Transfusions With Venous Thromboembolism in a North American Registry*. JAMA Surg, 2018. 153(9): p. 826-833.
226. Prudent, M., J.-D. Tissot, and N. Lion, *In vitro assays and clinical trials in red blood cell aging: Lost in translation*. Transfusion and Apheresis Science, 2015. 52(3): p. 270-276.
227. Heddle, N.M., et al., *Effect of Short-Term vs. Long-Term Blood Storage on Mortality after Transfusion*. N Engl J Med, 2016. 375(20): p. 1937-1945.
228. Hansen, A.L., et al., *The effect of processing method on the in vitro characteristics of red blood cell products*. Vox Sang, 2015. 108(4): p. 350-8.

229. Antonelou, M.H., et al., *Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome*. J Proteom, 2012. 76: p. 220-238.
230. Hod, E.A., et al., *Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound iron*. Blood, 2011. 118(25): p. 6675-82.
231. Delobel, J., et al., *Proteomics of the red blood cell carbonylome during blood banking of erythrocyte concentrates*. Proteomics Clin Appl, 2016. 10(3): p. 257-66.
232. Delobel, J., et al., *Subcellular fractionation of stored red blood cells reveals a compartment-based protein carbonylation evolution*. J Proteomics, 2012. 76 Spec No.: p. 181-93.
233. Mustafa, I., et al., *Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM*. BioMed Research International, 2016. 2016: p. 1-7.
234. Bardyn, M., et al., *Red blood cells ageing markers: a multi-parametric analysis*. Blood Transfus, 2017. 15(3): p. 239-248.
235. Hashemi Tayer, A., et al., *Procoagulant Activity of Red Blood Cell-Derived Microvesicles during Red Cell Storage*. Transfus Med Hemother, 2019. 46(4): p. 224-230.
236. Richter, J.R., et al., *Leukoreduction of packed red blood cells attenuates proinflammatory properties of storage-derived microvesicles*. J Surg Res, 2018. 223: p. 128-135.
237. Bicalho, B., A.S. Pereira, and J.P. Acker, *Buffy coat (top/bottom)- and whole-blood filtration (top/top)-produced red cell concentrates differ in size of extracellular vesicles*. Vox Sang, 2015. 109(3): p. 214-20.
238. Almizraq, R.J., et al., *Blood manufacturing methods affect red blood cell product characteristics and immunomodulatory activity*. Blood Adv, 2018. 2(18): p. 2296-2306.
239. Yin, Z., et al., *Blood transfusion and mortality in myocardial infarction: an updated meta-analysis*. Oncotarget, 2017. 8(60): p. 102254–102262.
240. Mikkola, R., et al., *Use of blood products and risk of stroke after coronary artery bypass surgery*. Blood Transfus, 2012. 10(4): p. 490-501.
241. Goel, R., et al., *Perioperative Transfusions and Venous Thromboembolism*. Pediatrics, 2020. 145(4): p. e20192351.
242. Yap, C.H., et al., *Age of transfused red cells and early outcomes after cardiac surgery*. Ann Thorac Surg, 2008. 86(2): p. 554-9.
243. Katsios, C., et al., *Red blood cell transfusion and increased length of storage are not associated with deep vein thrombosis in medical and surgical critically ill patients: a prospective observational cohort study*. Critical Care 2011. 15: p. 1-8.
244. Muszynski, J.A., et al., *Supernatants from stored red blood cell (RBC) units, but not RBC-derived microvesicles, suppress monocyte function in vitro*. Transfusion, 2015. 55(8): p. 1937-45.
245. Chin-Yee, et al., *Supernatant from stored red cells activates neutrophils*. Transfus Med, 1998. 8(1): p. 49-56.
246. McFaul, S.J., et al., *Packed blood cells stored in AS-5 become proinflammatory during storage*. Transfusion, 2009. 49(7): p. 1451-1460.
247. Hardy, J.-F., F. de Moerloose, and M. Samama, *Massive transfusion and coagulopathy: pathophysiology and implications for clinical management*. General Anesthesia, 2004. 51(4): p. 293–310.
248. Matheu, F.A. and S.J. McFaul, *Supernates from stored red blood cells inhibit platelet aggregation*. Transfusion, 2010. 50(6): p. 1196-202.

249. Singhal, R., et al., *Hemoglobin interaction with GPIbalph induces platelet activation and apoptosis: a novel mechanism associated with intravascular hemolysis*. *Haematologica*, 2015. 100(12): p. 1526-33.
250. Iuliano, L., et al., *Free radical-mediated platelet activation by hemoglobin released from red blood cells*. *Arch Biochem Biophys*, 1992. 299(2): p. 220-224.
251. McFaul, S.J., et al., *Packed blood cells stored in AS-5 become proinflammatory during storage*. *Transfusion*, 2009. 49(7): p. 1451-60.
252. Yun, S.-H., et al., *Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers*. *Biomed Res Int*, 2016. 2016: p. 1-5.
253. Said, A.S., S.C. Rogers, and A. Doctor, *Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions*. *Front Physiol*, 2017. 8: p. 1120.
254. Silvain, J., et al., *Impact of red blood cell transfusion on platelet aggregation and inflammatory response in anemic coronary and noncoronary patients: the TRANSFUSION-2 study (impact of transfusion of red blood cell on platelet activation and aggregation studied with flow cytometry use and light transmission aggregometry)*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. 63(13): p. 1289-1296.
255. Chiabrando, D., et al., *Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes*. *Front Pharmacol*, 2014. 5(61): p. 1-24.
256. Rifkind, J.M., J.G. Mohanty, and E. Nagababu, *The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions*. *Front Physiol*, 2015. 5(500): p. 1-7.
257. Villagra, J., et al., *Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin*. *Blood*, 2007. 110(6): p. 2166-72.
258. Iuliano, L., et al., *Oxygen Free Radicals And Platelet Activation*. *Free Radical Biology & Medicine*, 1997. 22(2): p. 999-1006.
259. Buehler, P.W. and E. Karnaukhova, *When might transferrin, hemopexin or haptoglobin administration be of benefit following the transfusion of red blood cells?* *Curr Opin Hematol*, 2018. 25(6): p. 452-458.
260. Antosik, A. and H.M. Żbikowska, *Koncentraty krwinek czerwonych w transfuzjologii*. *Kosmos*, 2014. 63(1): p. 13-23.
261. Sun, Y., et al., *Hemostatic function of packed red blood cells: an in-vitro study*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2015. 26(7): p. 784-92.
262. Kozakiewicz, B. and M. Kaczmarczyk, *Cisplatyna – lek z przypadku*. *Curr. Gynecol. Oncol.*, 2012. 10(2): p. 131-140.
263. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. *Eur J Pharmacol*, 2014. 740: p. 364-78.
264. Sarin, N., et al., *Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest*. *PLoS One*, 2017. 12(7): p. e0181081.
265. Brozovic, A., A. Ambriovic-Ristov, and M. Osmak, *The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin*. *Crit Rev Toxicol*, 2010. 40(4): p. 347-59.
266. Rudnicka, K.W., et al., *Apoptoza i Autofagia Mechanizmy i Metody Detekcji*. *Post Biol Kom*, 2011. 38(2): p. 247-265.
267. Zapolska-Downar, D., G. Sygitowicz, and M. Jarosz, *Znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy*. *Kardiol Pol* 2008. 66(10): p. 347-357.
268. Galadari, S., et al., *Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?* *Free Radic Biol Med*, 2017. 104: p. 144-164.

269. Goubran, H.A., et al., *Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment*. Cancer Growth Metastasis, 2014. 7: p. 9-18.
270. Pascu, E.G., et al., *The Involvement of Oxidative Stress in Chronic Myeloid Leukemia*. Romanian Biotechnological Letters, 2020. 25(1): p. 1267-1274.
271. Barnett, C.C., Jr., et al., *Intravenous delivery of the plasma fraction of stored packed erythrocytes promotes pancreatic cancer growth in immunocompetent mice*. Cancer, 2010. 116(16): p. 3862-74.
272. Zhuang, Y., et al., *Effect of Storage Time on Cumulation of Platelet-related Growth Factors in the Supernatant of Leukoreduced Packed Red Cells and Tumor Cell Proliferation In Vitro*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2015. 23(2): p. 541-5.
273. Zhuang, Y., et al., *[Effect of leukoreduction on tumor-associated cytokine accumulation in supernatant of stored packed red cells and its effect on tumor cell proliferation in vitro]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2015. 23(1): p. 217-21.
274. Zhuang, Y., et al., *[Accumulative regularity of tumor-associated noncellular components in supernatant of stored packed red cells]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2014. 22(3): p. 812-6.
275. Aalaei, S., M. Mohammadzadeh, and Y. Pazhang, *Synergistic induction of apoptosis in a cell model of human leukemia K562 by nitroglycerine and valproic acid*. Excli J, 2019. 18: p. 619-630.
276. Yde, C.W. and O.-G. Issinger, *Enhancing cisplatin sensitivity in MCF-7 human breast cancer cells by down-regulation of Bcl-2 and cyclin D1*. Int J Oncol, 2006. 29: p. 1397-1404.
277. Ping, G., et al., *Silencing long noncoding RNA PVT1 inhibits tumorigenesis and cisplatin resistance of colorectal cancer*. Am J Transl Res 2018. 10(1): p. 138-149.
278. Potapova, O., et al., *The Jun Kinase/Stress-activated Protein Kinase Pathway Functions to Regulate DNA Repair and Inhibition of the Pathway Sensitizes Tumor Cells to Cisplatin*. J Biol Chem, 1997. 272(22): p. 14041-14044.
279. Kang, S.H., et al., *Protective effect of Bojungbangdocktang on cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in MCF-10A breast endothelial cells*. Environ Toxicol Pharmacol, 2009. 28(3): p. 430-8.
280. Sorensen, B.H., U.A. Thorsteinsdottir, and I.H. Lambert, *Acquired cisplatin resistance in human ovarian A2780 cancer cells correlates with shift in taurine homeostasis and ability to volume regulate*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. 307(12): p. C1071-80.
281. Rasool, M., et al., *Assessment of circulating biochemical markers and antioxidative status in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) patients*. Saudi J Biol Sci, 2015. 22(1): p. 106-11.
282. Szmajda, D., E. Balcerczak, and A. Krygier, *Standardy diagnostyki oraz nowe trendy w leczeniu ostrej białaczki szpikowej*. Acta Haematol Pol, 2017. 48(4): p. 291-299.
283. Prada-Arismendy, J., J.C. Arroyave, and S. Rothlisberger, *Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia*. Blood Rev, 2017. 31(1): p. 63-76.
284. Budziszewska, B.K., et al., *Zachorowalność i chorobowość na nowotwory układu krwiotwórczego w Polsce (2009–2015) określone na podstawie analizy danych Narodowego Funduszu Zdrowia wykorzystanych w projekcie „Mapy potrzeb zdrowotnych — baza analiz systemowych i wdrożeniowych”*. Hematologia, 2017. 8(2): p. 89-104.
285. Hayes, J.D., A.T. Dinkova-Kostova, and K.D. Tew, *Oxidative Stress in Cancer*. Cancer Cell, 2020. 38(2): p. 167-197.
286. Udensi, U.K. and P.B. Tchounwou, *Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. 33: p. 1-15.

287. Tsamesidis, I., et al., *Correlation of Oxidative Stress Biomarkers and Hematological Parameters in Blood Cancer Patients from Sardinia, Italy*. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2019. 13(2): p. 49-57.
288. Hlavackova, A., et al., *Alteration of Serum Malondialdehyde Level As Biomarker of Oxidative Stress during Acute Myeloid Leukemia Treatment*. Blood, 2019. 134(Supplement_1): p. 5181-5181.
289. Wierusz-Wysocka, B., A. Araszkiwicz, and J. Schlaffke, *Końcowe produkty glikacji — nowy biomarker cukrzycy i jej powikłań?* Diabet Klin, 2013. 2(3): p. 96–103.
290. Zeng, C., et al., *Clinical/Translational Aspects of Advanced Glycation End-Products*. Trends Endocrinol Metab, 2019. 30(12): p. 959-973.
291. Walter, K.R., et al., *Advanced glycation end products are elevated in estrogen receptor-positive breast cancer patients, alter response to therapy, and can be targeted by lifestyle intervention*. Breast Cancer Res Treat, 2019. 173(3): p. 559-571.
292. Kim, J.Y., et al., *Advanced glycation end product (AGE)-induced proliferation of HEL cells via receptor for AGE-related signal pathways*. Int J Oncol, 2008. 33: p. 493-501.
293. Kaweme, N.M., et al., *The significant role of redox system in myeloid leukemia: from pathogenesis to therapeutic applications*. Biomark Res, 2020. 8(63): p. 1-12.
294. Chen, Y., et al., *Oxidative resistance of leukemic stem cells and oxidative damage to hematopoietic stem cells under pro-oxidative therapy*. Cell Death Dis, 2020. 11(4): p. 291.
295. Chlebowska, J., *Stres siateczki śródplazmatycznej i stres oksydacyjny w ostrych białaczkach szpikowych*. Acta Haematol Pol, 2016. 47(3): p. 197-204.
296. Turell, L., R. Radi, and B. Alvarez, *The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes*. Free Radic Biol Med, 2013. 65: p. 244-253.
297. Czajka, A., *Wolne Rodniki Tlenowe A Mechanizmy Obronne Organizmu*. Now Lek, 2006. 75(6): p. 582–586.
298. Koza, K., A. Łoniewska-Lwowska, and J. Fabijańska-Mitek, *Stres oksydacyjny w krwinkach czerwonych dawców oraz pacjentów z talasemiami i hemoglobinopatiami*. Post N Med, 2016. XXIX(2): p. 113-118.
299. Grzebyk, E. and A. Piwowar, *Modyfikacje glikooksydacyjne albuminy w badaniach medycznych*. Pol Merk Lek, 2013. XXXIV(202): p. 239-242.
300. Ognik, K. and E. Cholewińska, *Biomarkery Wykorzystywane W Ocenie Oksydacyjnych Uszkodzeń Białek*. Kosmos, 2018. 67(2): p. 347–359.
301. Kołodziejczyk, J., *3-nitrotyrozyna - marker stresu oksydacyjnego in vitro i in vivo*. Diagn Lab, 2010. 46(2): p. 141-145.
302. Ng, M.S.Y., J.P. Tung, and J.F. Fraser, *Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now?* Transfus Med Rev, 2018. 32(2): p. 144-154.
303. *Obwieszczenie ministra zdrowia z dnia 6 marca 2019 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi*. 2019: p. 1-284.
304. Rinalducci, S. and L. Zolla, *Biochemistry of storage lesions of red cell and platelet concentrates: A continuous fight implying oxidative/nitrosative/phosphorylative stress and signaling*. Transfus Apher Sci, 2015. 52(3): p. 262-269.
305. Prudent, M., *What about Platelet Function in Platelet Concentrates?* Hämostaseologie, 2020. 40(04): p. 500-508.
306. Wang, L., et al., *The contribution of oxidative stress to platelet senescence during storage*. Transfusion, 2019. 59(7): p. 2389-2402.

307. Larsen, A.M., et al., *Haemostatic function and biomarkers of endothelial damage before and after platelet transfusion in patients with acute myeloid leukaemia*. *Transfus Med*, 2015. 25(3): p. 174-83.
308. Sharma, G., et al., *Study on serum lactate dehydrogenase level in precancerous, cancerous, and healthy subjects*. *Asian J Pharm Clin Res*, 2016. 9(3): p. 328-330.
309. Sarnowska, E., et al., *Zaburzenia metabolizmu i funkcji enzymów metabolicznych a proces nowotworzenia*. *Nowotwory J Oncol*, 2016. 66(2): p. 151-159.
310. Pogłód, R., et al., *Analiza poważnych niepożądanych zdarzeń i poważnych niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych w Polsce w latach 2011–2014 Część II. Reakcje poprzetoczeniowe niezwiązane z obcogrupowym przetoczeniem składników krwi*. *J Transfus Med*, 2018. 11(3): p. 75–90.

17. Spis tabel i rycin

TABELA 1. CYTOKINY O WŁAŚCIWOŚCIACH PRO-NOWOTWOROWYCH ZIDENTYFIKOWANE W ŚWIEŻYCH I DŁUGO PRZECHOWYWANYCH KKCZ. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [123].....	28
TABELA 2. RANDOMIZOWANE KONTROLNE BADANIA KLINICZNE (RCT) BADAJĄCE WPŁYW PRZETOCZENIA „ŚWIEŻYCH” I „STARYCH” KKCZ W RÓŻNYCH GRUPACH BADANYCH. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [30, 57, 62, 134-139].....	37
TABELA 3. STOPNIE NASILENIA NIEDOKRWISTOŚCI WZGLĘDEM STĘŻENIA HEMOGLOBINY WE KRWI PACJENTA (WG. DANYCH WHO) [140].	38
TABELA 4. PRZEPROWADZONE BADANIA DOTYCZĄCE WPŁYWU OKOŁOOPERACYJNEGO PRZETOCZENIA KKCZ NA PACJENTÓW ONKOLOGICZNYCH [153].	43
TABELA 5. SPECYFIKACJA LINII KOMÓRKOWYCH WYKORZYSTANYCH DO BADAŃ	57
TABELA 6. CHARAKTERYSTYKA PACJENTÓW UCZESTNICZĄCYCH W BADANIU	61
TABELA 7. ODCZYNNIKI CHEMICZNE ZASTOSOWANE W BADANIACH	63
TABELA 8. WARUNKI HODOWLI KOMÓREK W POSZCZEGÓLNYCH OZNACZENIACH	78
TABELA 9. SCHEMAT PRZYGOTOWANIA POSZCZEGÓLNYCH PRÓB.....	92
TABELA 10. CHARAKTERYSTYKA SUPERNATANTÓW Z KKCZ WYKORZYSTANYCH W BADANIACH	95
TABELA 11. LICZBA PRZETOCZONYCH JEDNOSTEK SKŁADNIKÓW KRWI W ODDZIAŁACH WWCOIT IM. M. KOPERNIKA W LATACH 2013-2016* WRAZ Z ILOŚCIĄ ZAISTNIAŁYCH ODCZYŃNÓW I WSPÓŁCZYNNIKIEM LICZBY REAKCJI NIEPOŻĄDANYCH	127
TABELA 12. DANE DEMOGRAFICZNE PACJENTÓW WWCOIT IM. M. KOPERNIKA W ŁODZI, U KTÓRYCH WYSTĄPIŁY NIEPOŻĄDANE REAKCJE POPRZETOCZENIOWE W LATACH 2013-2016 WRAZ Z POZIOMEM PRZYCZYŃOWOŚCI, ILOŚCIĄ ZAISTNIAŁYCH ODCZYŃNÓW POPRZETOCZENIOWYCH I WSPÓŁCZYNNIKIEM LICZBY REAKCJI NIEPOŻĄDANYCH.....	128
TABELA 13. RODZAJE SKŁADNIKÓW KRWI, PO PRZETOCZENIU KTÓRYCH WYSTĄPIŁY NIEPOŻĄDANE REAKCJE POPRZETOCZENIOWE U BIORCÓW.....	129
TABELA 14. KLASYFIKACJA NIEPOŻĄDANYCH REAKCJI POPRZETOCZENIOWYCH U PACJENTÓW WWCOIT IM. M. KOPERNIKA W ŁODZI W LATACH 2013-2016	130
TABELA 15. WYSTĘPOWANIE NIEPOŻĄDANYCH REAKCJI POPRZETOCZENIOWYCH.....	131
RYCINA 1. ZMIANY ZACHODZĄCE W PRZECHOWYWANYCH KKCZ. STRZAŁKI POWYŻEJ LINII BAZOWEJ REPREZENTUJĄ WZROST, A PONIŻEJ SPADEK ZMIENNEJ. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [39]. SKRÓTY: ATP (ANG. ADENOSINE TRIPHOSPHATE), ADENOZYNOTRIFOSFORAN; DPG (ANG. DIPHOSPHOGLYCERATE), DIFOSFOGLICERYNIAN; Hb, HEMOGLOBINA; IL (ANG. INTERLEUKIN), INTERLEUKINA; MAC (ANG. MEMBRANE ATTACK COMPLEXES), KOMPLEKSY ATAKUJĄCE BŁONĘ; MDA (ANG. MALONDIALDEHYDE), DIALDEHYD MALONOWY; MPs (ANG. MICROPARTICLES), MIKROCZĄSTKI; NADH (ANG. NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE), DINUKLEOTYD NIKOTYNAMIDOADENINOWY (POSTAĆ ZREDUKOWANA); NO (ANG. NITRIC OXIDE), TLENKU AZOTU; PS (ANG. PHOSPHATIDYL SERINE), FOSFATYDYLOSERYNA; RBC (ANG. RED BLOOD CEL), KRWINKA CZERWONA; RFT, REAKTYWNE FORMY TLENU; TGF (ANG. TRANSFORMING GROWTH FACTOR), TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU; TNF (ANG. TUMOR NECROSIS FACTOR), CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW.	18
RYCINA 2. ZMIENNOŚĆ DAWCÓW JAKO PROBLEM TRANSFUZJOLOGII. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [44-47].....	19
RYCINA 3. SKUTKI NADMIARU POZAKOMÓRKOWEJ HEMOGLOBINY (Hb) W NACZYNIACH KRWIONOŚNYCH. W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH OSOCZOWA HAPTOGLOBINA (Hp) WIĄŻE WOLNĄ Hb HAMUJĄC JEJ AKTYWNOŚĆ PRO-OKSYDACYJNĄ. W SYTUACJI, GDY Hp NIE JEST W STANIE WYCHWYCIĆ TAK DUŻYCH ILOŚCI POZAKOMÓRKOWEJ Hb DOSTARCZONEJ PODCZAS PRZETOCZENIA KKCZ, NIEZWIĄZANA, WOLNA Hb WYCHWYTUJE NO POCHODZĄCY ZE ŚRÓDBŁONKA, TWORZĄC METHEMOGLOBINĘ (MET-Hb) I NO ₃ ⁻ . ZMNIJSZONA BIODOSTĘPNOŚĆ NO U BIORCÓW POWODUJE ZMIANY NAPIĘCIA NACZYNIOWEGO, AKTYWACJĘ PŁYTEK KRWI I ODPOWIEDŹ ZAPALNĄ, CO DALEJ MOŻE PROWADZIĆ DO NIEDOKRWIENIA TKANEK I USZKODZENIA NARZĄDÓW WEWNĘTRZNYCH. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [15, 65]. SKRÓTY: Hb, HEMOGLOBINA; HO-1, OKSYGENAZA HEMOWA-1; Hp, HAPTOGLOBINA; MET-Hb, METHEMOGLOBINA; NO, TLENEK AZOTU; NTBI, ŻELAZO NIEZWIĄZANE Z TRANSFERYNĄ; RBC, KRWINKA CZERWONA.....	22
RYCINA 4. HIPOTEZA DOTYCZĄCA UDZIAŁU ŻELAZA W ZAKAŻENIU BAKTERYJNYM PO PRZETOCZENIA STARSZYCH KKCZ. (A) ŻELAZO UWOLNIONE Z Hb PO WCHŁONIĘCIU KRWIŃEK CZERWONYCH PRZEZ MAKROFAGI PRZEDSTAWIAJĄ ZIELONE KÓŁKA, WEWNĄTRZKOMÓRKOWO SYNTETYZOWANE I UWALNIANE CYTOKINY TO ŻÓLTE KÓŁKA, NIEBIESKI CYLINDER W MAKROFAGACH PRZEDSTAWIA FERROPORTYNĘ (KANAL EKSPORTU ŻELAZA Z WNETRZA KOMÓRKI). (B) MODEL PRZEDSTAWIAJĄCY HIPOTETYCZNY MECHANIZM POCHŁANIANIA „STARSZYCH” KRWIŃEK CZERWONYCH PRZEZ MAKROFAGI, W KTÓRYM AKTYWACJA CZYNNIKA NFκB ORAZ KOMPLEKSU INFLAMASOMU POPRZECZ SZLAK SYGNAŁOWY 1 ORAZ 2, PROWADZI DO PRODUKCJI CYTOKIN PROZAPALNYCH ODPOWIEDZIALNYCH ZA INICJACJĘ I PODTRZYMANIE MIEJSCOWEGO STANU ZAPALNEGO. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [82]. SKRÓTY: CO, TLENEK WĘGLA; HO-1, OKSYGENAZA HEMOWA-1; IL, INTERLEUKINA; MCP-1, BIAŁKO CHEMOATRAKTANTA MONOCYTÓW-1; NLRP, PODTYP RECEPTORA NOD-PODOBNEGO; NTBI, ŻELAZO NIEZWIĄZANE Z TRANSFERYNĄ; RFT,	

REAKTYWNE FORMY TLENU.....	23
RYCINA 5. WŁAŚCIWOŚCI EMPs POCHODZĄCYCH Z KKCZ NA PODSTAWIE DOSTĘPNYCH WYNIKÓW BADAŃ <i>IN VITRO</i> . OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [16, 76, 106, 111-113].	25
RYCINA 6. SZLAKI INICJACJI KASKADY KRZEPNIĘCIA INDUKOWANE PRZEZ MIKROCZĄSTKI POCHODZENIA ERYTROCYTARNEGO OBECNE W KKCZ. EMPs BEZPOŚREDNIO PROMUJĄ AKTYWACJĘ FXII I PK, PROWADZĄC DO TWORZENIA FXIIA I PKA. CZYNNIK XIIA DODATKOWO AKTYWUJE PK, PODCZAS GDY PKA AKTYWUJE FXII. DO AKTYWACJI CZYNNIKA IX DOCHODZI POPRZECZ DWA NIEZALEŻNE SZLAKI. SZLAK ZAZNACZONY KOLOREM NIEBIESKIM, W KTÓRYM FXIIA POŚREDNIO AKTYWUJE FIX PO AKTYWACJI FXI, ORAZ SZLAK ALTERNATYWNY PRZEDSTAWIONY KOLOREM CZERWONYM, W KTÓRYM PKA BEZPOŚREDNIO AKTYWUJE FIX. OBA SZLAKI OSTATECZNIE PROWADZĄ DO TWORZENIA TROMBINY PRZEZ WSPÓLNY SZLAK. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [118, 119].	26
RYCINA 7. PUFAS I OKSYLIPINY W PRZECHOWYWANYCH KKCZ. WYKRES KOŁOWY PRZEDSTAWIA ZAWARTOŚĆ PUFAS W FILTROWANYCH KKCZ W 42. DNIU PRZECHOWYWANIA. NAD STRZAŁKAMI ZAMIESZCZONO POTENCJALNY SZLAK PRODUKCJI OKSYLIPIN POWIĄZANYCH Z ODPOWIEDNIM PREKURSOREM. W NIEFILTROWANYCH JEDNOSTKACH, 12-HETE, 14-HDOHE I 12-HEPE WYKRYTO W ZNACZNIE WYŻSZYCH STĘŻENIACH NIŻ W LEUKOREDUKOWANYCH. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [44].	30
RYCINA 8. BIAŁKA ZIDENTYFIKOWANE W SUPERNATANTACH NIEFILTROWANYCH ORAZ FILTROWANYCH KKCZ W 1. I 42. DNIU PRZECHOWYWANIA. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [131].	32
RYCINA 9. ŚREDNI CZAS PRZECHOWYWANIA KKCZ WYKORZYSTANYCH W OSTATNICH BADAANIACH KLINICZNYCH. (*, ŚREDNIA ± SD; #, MEDIANA ± PERCENTYL 25 I 75). OPRACOWANO NA PODSTAWIE [39].	35
RYCINA 10. MECHANIZMY PROGRESJI CHOROBY NOWOTWOROWEJ PO PRZETOCZENIU KKCZ. TRANSFUZJA KRWINEK CZERWONYCH SPRZYJA NAWROTOWI LUB PROGRESJI RAKA POPRZECZ MECHANIZMY OBEJMUJĄCE IMMUNOMODULACJĘ, STAN ZAPALNY I DZIAŁANIE CZYNNIKÓW WZROSTU. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [153]. SKRÓTY: IL, INTERLEUKINA; KKCZ, KONCENTRAT KRWINEK CZERWONYCH; NF-κB: CZYNNIK JĄDROWY KAPPA B; TGF-β, TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU B; TREG, LIMFOCYTY T REGULATOROWE; TRIM, IMMUNOMODULACJA ZWIĄZANA Z PRZETOCZENIEM.	39
RYCINA 11. MEDIATORY PRO-NOWOTWOROWE I PRO-ZAPALNE OBECNE W SUPERNATANTACH KKCZ. OPRACOWANIE WŁASNE NA PODSTAWIE [15, 34, 38, 123, 133, 169-174]. SKRÓTY: bFGF (ANG. BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR), PODSTAWOWY CZYNNIK WZROSTU FIBROBLASTÓW; EGF (ANG. EPIDERMAL GROWTH FACTOR), NASKÓRKOWY CZYNNIK WZROSTU; ENA (ANG. NEUTROPHIL-ACTIVATING PROTEIN), BIAŁKO AKTYWUJĄCE NEUTROFILE; GRO (ANG. GROWTH-RELATED ONCOGENE), ONKOGEN ZWIĄZANY ZE WZROSTEM; IFN (ANG. INTERFERON), INTERFERON; IGF (ANG. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR), INSULINOPODOBNY CZYNNIK WZROSTU; IL (ANG. INTERLEUKIN), INTERLEUKINA; LYSO-PC (ANG. LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE), LIZOFOSFATYDYLOCHOLINA; MCP (ANG. MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN), BIAŁKO CHEMOTAKTYCZNE MONOCYTÓW; MIF (ANG. MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR), CZYNNIK HAMUJĄCY MIGRACJĘ MAKROFAGÓW; MIP (ANG. MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN), BIAŁKO MAKROFAGA AKTYWOWANEGO; PDGF (ANG. PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR), PŁYTKOWY CZYNNIK WZROSTU; PGE2 (ANG. PROSTAGLANDIN E2), PROSTAGLADYNA E2; PGI2 (ANG. PROSTACYCLIN I2), PROSTACYKLINA I2; SDF (ANG. STROMAL CELL-DERIVED FACTOR), ZRĘBOWY CZYNNIK WZROSTU; TGF (ANG. TRANSFORMING GROWTH FACTOR β), TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU; TNF (ANG. TUMOR NECROSIS FACTOR), CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORU; TPA (ANG. TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR), TKANKOWY AKTYWATOR PLAZMINOGENU; UPA (ANG. UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR), UROKINAZOWY AKTYWATOR PLAZMINOGENU; VEGF (ANG. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR), CZYNNIK WZROSTU ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO.....	41
RYCINA 12. PATOFIZJOLOGIA TRIM I JEJ WPŁYW NA WZROST NOWOTWORU I PRZERZUTY. OPRACOWANO NA PODSTAWIE [162]. SKRÓTY: EMP (ANG. ERYTHROCYTE-DERIVED MICROPARTICLES), MIKROCZĄSTKI POCHODZENIA ERYTROCYTARNEGO; Hb (ANG. HAEMOGLOBIN), HEMOGLOBINA; TNF-β (ANG. TUMOR NECROSIS FACTOR- β), CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORU-β.	42
RYCINA 13. PREPARATYKA JEDNOSTEK KKCZ WYKORZYSTANYCH W BADAANIACH WYKONANA NA ZAMÓWIENIE W RCKIK (OPRACOWANIE WŁASNE)	56
RYCINA 14. PROCEDURA OTRZYMYWANIA SUPERNATANTÓW Z JEDNOSTEK KKCZ (OPRACOWANIE WŁASNE)	66
RYCINA 15. PRZYKŁADOWE REPREZENTATYWNE WYKRESY DOT PLOT (PUNKTOWE; PARAMETR FSC VERSUS SSC) ORAZ HISTOGRAMY CYTOMETRYCZNE PRZEDSTAWIAJĄCE POPULACJĘ MIKROCZĄSTEK ERYTROCYTARNYCH (BRAMKA P2 OZNACZONA STRZAŁKĄ) W SUPERNATANCIE OTRZYMANYM Z NIEFILTROWANEJ ORAZ Poddanej LEUKOREDUKCJI JEDNOSTKI KKCZ W 1. ORAZ 42. DNIU PRZECHOWYWANIA. BRAMKA P1 - KULKI KALIBRACYJNE O ŚREDNICY 2,0 μm.....	96
RYCINA 16. REPREZENTATYWNE ZDJĘCIA OBRAZUJĄCE: PROCES UWALNIANIA EMP PRZEZ KRWINKĘ CZERWONĄ (A) ORAZ ZMIANY MORFOLOGICZNE ERYTROCYTÓW (B) W UKKCZ WYKONANE PRZY POMOCY FLUORESCENCYJNEGO MIKROSKOPU KONFOKALNEGO Z WYKORZYSTANIEM BARWNIKA NEURO-DiO (BIOTIUM, INC.). PRZED OBRAZOWANIEM KOMÓRKI NIE BYŁY UTRWALANE. DODATKOWO ZAMIESZCZONO OBRAZY UKKCZ Z MIKROSKOPU KONTRASTOWO-FAZOWEGO O ODWRÓCONEJ OPTYCE (AXIO OBSERVER.D1, CARL ZEISS; POWIĘKSZENIE 600x) (C – DZIEŃ 1; D – DZIEŃ 42).	98
RYCINA 17. OBRAZ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK OBECNYCH W SUPERNATANTACH KKCZ W 1. ORAZ 42. DNIU PRZECHOWYWANIA. KOLOREM CZERWONYM ZAZNACZONO PASMO ODPOWIADAJĄCE ŁAŃCUCHOWI Hb (~15 kDa), KTÓRE ZAOBSERWOWANO W OSTATNIM DNIU PRZECHOWYWANIA W OBU TYPAH SUPERNATANTÓW. ZAMIESZCZONY ELEKTROFEROGRAM PRZEDSTAWIA REPREZENTATYWNY ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY OTRZYMANY W JEDNYM Z KILKUNASTU WYKONANYCH NIEZALEŻNYCH	

DOŚWIADCZENIACH.....	99
RYCINA 18. DETEKcja GRUP KARBONYLOWYCH TECHNIKĄ WESTERN BLOT W BIAŁKACH SUPERNATANTÓW KKCz. (A) MEMBRANĘ NIETRWAŁE WYBARWIONO W 0,1% ROZTWORZE CZERWIENI PONCEAU W 5% KWASIE OCTOWYM (B) ZAMIESZCZONA RYCINA PRZEDSTAWIA REPREZENTATYWNY OBRAZ OTRZYMANY W JEDNYM Z KILKU WYKONANYCH NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZENIACH. (1-4) SUPERNATANT FILTROWANYCH KKCz (1, 3 – DZIEŃ 1; 2, 4 – DZIEŃ 42); (6-9) SUPERNATANT NIEFILTROWANYCH KKCz (6, 8 – DZIEŃ 1; 7, 9 – DZIEŃ 42); (5, 10) WZORZEC PRECISION PLUS PROTEIN™ STANDARDS (BIO-RAD).	99
RYCINA 19. ADHEZJA PŁYTEK KRWI, PRE-INKUBOWANYCH (37°C, 15 MIN.) Z SUPERNATANTAMI LUB ICH FILTRATAMI, ZAWIERAJĄCYMI CZĄSTECZKI O MASIE PONIŻEJ 10 kDa, (A: SPOCZYNKOWYCH ORAZ B: STYMULOWANYCH TROMBINĄ W STĘŻENIU KOŃCOWYM 0,1 U/ML) DO FIBRYNOGENU (0,1 MG/ML). DANE NA WYKRESACH PRZEDSTAWIAJĄ WARTOŚCI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD. WYNIKI PRZELICZONO W STOSUNKU DO KONTROLI (PŁYTKI KRWI NIETRAKTOWANE), KTÓRYCH STOPIEŃ ADHEZJI PRZYJĘTO ZA 100%. */# p<0,05; ** p<0,01; ### p<0,001; n = 34 (PŁYTKI KRWI WYZOLOWANO OD 10 RÓŻNYCH DAWCÓW).	101
RYCINA 20. ADHEZJA PŁYTEK KRWI, PRE-INKUBOWANYCH (37°C, 15 MIN.) Z SUPERNATANTAMI LUB ICH FILTRATAMI (A: SPOCZYNKOWYCH ORAZ B: STYMULOWANYCH TROMBINĄ W STĘŻENIU KOŃCOWYM 0,1 U/ML) DO KOLAGENU (0,02 MG/ML). DANE NA WYKRESACH PRZEDSTAWIAJĄ WARTOŚCI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD. WYNIKI PRZELICZONO W STOSUNKU DO KONTROLI (PŁYTKI KRWI NIETRAKTOWANE), KTÓRYCH POZIOM ADHEZJI PRZYJĘTO ZA 100%. # p<0,05; **/## p<0,01; *** p<0,001; n = 34 (PŁYTKI KRWI WYZOLOWANO OD 10 RÓŻNYCH DAWCÓW).....	101
RYCINA 21. AGREGACJA PŁYTEK KRWI W OSOCZU BOGATOPŁYTKOWYM UPREDNIO INKUBOWANYM (37°C, 15 MIN.) Z SUPERNATANTAMI LUB ICH FILTRATAMI INDUKOWANA FIZJOLOGICZNYM AGONISTĄ - KOLAGENEM (2 µG/ML) (A) DANE PRZEDSTAWIAJĄ WARTOŚCI ŚREDNIE ± SD (% KONTROLI), GDZIE ZA 100% PRZYJĘTO STOPIEŃ AGREGACJI KOMÓREK KONTROLNYCH (NIETRAKTOWANYCH). * p<0,05; n = 53 (17 RÓŻNYCH DAWCÓW). (B) PRZYKŁADOWE REPREZENTATYWNE WYKRESY PRZEBIEGU PROCESU AGREGACJI PŁYTEK KRWI ZAREJESTROWANE W AGREGOMETRZE OPTYCZNYM CHRONO-LOG® 490.	102
RYCINA 22. ANALIZA CYTOMETRYCZNA ODSETKA MIKROPŁYTEK [%] W PULI PŁYTEK KRWI SPOCZYNKOWYCH (A), STYMULOWANYCH KOLAGENEM (20 µG/ML; B) ORAZ ADP (20 µM; C). KREW PEŁNĄ UPREDNIO INKUBOWANO Z SUPERNATANTAMI (37°C, 15 MIN.). NIE WYKAZANO ZNAMIENNYCH STATYSTYCZNIE RÓŻNIC (p>0,05) POMIĘDZY KONTROLĄ (KREW PEŁNA) A KONTROLĄ Z SAGM. WYNIKI PRZEDSTAWIONO W POSTACI MEDIANY ± ROZSTĘP CWIARTKOWY Q3-Q1 („PUDEŁKO”), WARTOŚĆ MINIMALNA I MAKSYMALNA („WĄSY”). * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n = 44 (10 RÓŻNYCH DAWCÓW KRWI).	103
RYCINA 23. ANALIZA CYTOMETRYCZNA ODSETKA AGREGATÓW PŁYTKOWYCH [%] W PULI PŁYTEK KRWI SPOCZYNKOWYCH (A), STYMULOWANYCH KOLAGENEM (20 µG/ML; B) ORAZ ADP (20 µM; C). KREW PEŁNĄ UPREDNIO INKUBOWANO Z SUPERNATANTAMI (37°C, 15 MIN.). NIE WYKAZANO ZNAMIENNYCH STATYSTYCZNIE RÓŻNIC (p>0,05) POMIĘDZY KONTROLĄ (KREW PEŁNA) A KONTROLĄ Z SAGM. WYNIKI PRZEDSTAWIONO W POSTACI MEDIANY ± ROZSTĘP CWIARTKOWY Q3-Q1 („PUDEŁKO”), WARTOŚĆ MINIMALNA I MAKSYMALNA („WĄSY”). */# p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n = 44 (10 RÓŻNYCH DAWCÓW KRWI).....	103
RYCINA 24. ANALIZA CYTOMETRYCZNA EKSPRESJI SELEKTYNY P NA POWIERZCHNI PŁYTEK KRWI SPOCZYNKOWYCH (A), STYMULOWANYCH KOLAGENEM (20 µG/ML; B) ORAZ ADP (20 µM; C). KREW PEŁNĄ UPREDNIO INKUBOWANO Z SUPERNATANTAMI (37°C, 15 MIN.). NIE WYKAZANO ZNAMIENNYCH STATYSTYCZNIE RÓŻNIC (p>0,05) POMIĘDZY KONTROLĄ (KREW PEŁNA) A KONTROLĄ Z SAGM. WYNIKI PRZEDSTAWIONO W POSTACI MEDIANY ± ROZSTĘP CWIARTKOWY Q3-Q1 („PUDEŁKO”), WARTOŚĆ MINIMALNA I MAKSYMALNA („WĄSY”). * p<0,05; ## p<0,01; *** p<0,001; n = 44 (10 RÓŻNYCH DAWCÓW KRWI).	105
RYCINA 25. ANALIZA CYTOMETRYCZNA EKSPRESJI AKTYWNEJ FORMY GP IIb/IIIa NA POWIERZCHNI PŁYTEK KRWI SPOCZYNKOWYCH (A), STYMULOWANYCH KOLAGENEM (20 µG/ML; B) ORAZ ADP (20 µM; C). KREW PEŁNĄ UPREDNIO INKUBOWANO Z SUPERNATANTAMI (37°C, 15 MIN.). NIE WYKAZANO ZNAMIENNYCH STATYSTYCZNIE RÓŻNIC (p>0,05) POMIĘDZY KONTROLĄ (KREW PEŁNA) A KONTROLĄ Z SAGM. WYNIKI PRZEDSTAWIONO W POSTACI MEDIANY ± ROZSTĘP CWIARTKOWY Q3-Q1 („PUDEŁKO”), WARTOŚĆ MINIMALNA I MAKSYMALNA („WĄSY”). # p<0,05; **/## p<0,01; *** p<0,001; n = 44 (10 RÓŻNYCH DAWCÓW KRWI).	105
RYCINA 26. PRZYKŁADOWE REPREZENTATYWNE WYKRESY PUNKTOWE (DOT PLOT) ORAZ HISTOGRAMY CYTOMETRYCZNE PRZEDSTAWIAJĄCE SPOSÓB BRAMKOWANIA PULI MIKROPŁYTEK (ANG. <i>PMPs</i> ; <i>PLATELET-DERIVED MICROPARTICLES</i>) I AGREGATÓW PŁYTKOWYCH (ANG. <i>PAs</i> ; <i>PLATELET AGGREGATES</i>) W POPULACJI PŁYTEK KRWI NIEPOBUDZONYCH ORAZ STYMULOWANYCH FIZJOLOGICZNYMI AGONISTAMI (20 µG/ML KOLAGENEM; 20 µM ADP) PO UPREDNIEJ INKUBACJI Z BADANYMI SUPERNATANTAMI KKCz. ZASTOSOWANO ANTYPEN CD61, RECEPTOR BŁONOWY OBECNY NA POWIERZCHNI PŁYTEK KRWI, KTÓRY POZWALA ODRÓŻNIĆ RÓŻNE SUBPOPULACJE PŁYTEK OD INNYCH KOMÓREK OBECNYCH W BADANYCH PRÓBKACH. KAŻDORAZOWO MIERZONO FLUORESCENCJĘ 10 000 OBIEKTÓW CD61/PERCP-POZYTYWNYCH.....	106
RYCINA 27. PRZYKŁADOWE REPREZENTATYWNE HISTOGRAMY CYTOMETRYCZNE PRZEDSTAWIAJĄCE POZIOM EKSPRESJI SELEKTYNY P NA POWIERZCHNI PŁYTEK KRWI (SPOSÓB BRAMKOWANIA) NIEPOBUDZONYCH ORAZ STYMULOWANYCH FIZJOLOGICZNYMI AGONISTAMI (20 µG/ML KOLAGENEM; 20 µM ADP) PO UPREDNIEJ INKUBACJI Z BADANYMI SUPERNATANTAMI KKCz. ILOŚĆ OBIEKTÓW CD62P/PE-POZYTYWNYCH WYRAŻONO JAKO PROCENT CAŁKOWITEJ LICZBY PŁYTEK KRWI (10 000 OBIEKTÓW CD61/PERCP-POZYTYWNYCH).....	107
RYCINA 28. PRZYKŁADOWE REPREZENTATYWNE HISTOGRAMY CYTOMETRYCZNE PRZEDSTAWIAJĄCE POZIOM EKSPRESJI AKTYWNEJ FORMY	

RECEPTORA GP IIb/IIIa NA POWIERZCHNI PŁYTEK KRWI (SPOSÓB BRAMKOWANIA) NIEPOBUDZONYCH ORAZ STYMULOWANYCH FIZJOLOGICZNYMI AGONISTAMI (20 µg/ML KOLAGENEM; 20 µM ADP) PO UPRZEDNIEJ INKUBACJI Z BADANYMI SUPERNATANTAMI KKCz. ILOŚĆ OBIEKTÓW PAC-1/FITC-POZYTYWNYCH WYRAŻONO JAKO PROCENT CAŁKOWITEJ LICZBY PŁYTEK KRWI (10 000 OBIEKTÓW CD61/PERCP-POZYTYWNYCH).....	108
RYCINA 29. POMIAR CZASU TROMBINOWEGO (TT; A), PROTROMBINOWEGO (PT; B) ORAZ KAOLINOWO-KEFALINOWEGO (APTT; C) OSOCZA UPREDNIO INKUBOWANEGO Z SUPERNATANTAMI. DANE PRZEDSTAWIAJĄ WARTOŚCI ŚREDNIE ± SD; N = 53 (17 RÓŻNYCH DAWCÓW KRWI).	109
RYCINA 30. PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK LINII K-562 PO 24-GODZINNEJ INKUBACJI Z SUPERNATANTAMI (20%, 10%, 5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (10 µM). WYKRESY PRZEDSTAWIAJĄ WARTOŚCI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 5 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (A, B; N = 25) ORAZ 10 NIEZALEŻNYCH EKSPERYMENTÓW (C; N = 50). UZYSKANE WYNIKI PRZEDSTAWIONO JAKO % KONTROLI (ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). * P<0,05 VS. KONTROLA (KOMÓRKI NIETRAKTOWANE); ## P<0,01 VS. KONTROLA Z CISPT (KOMÓRKI TRAKTOWANE CISPT); ***/### P<0,001 W PORÓWNIANIU DO ODPOWIEDNIEJ KONTROLI.	110
RYCINA 31. PROLIFERACJA KOMÓREK LINII K-562 PO 24-GODZINNEJ INKUBACJI Z SUPERNATANTAMI (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (10 µM). DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 3 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 15). UZYSKANE WYNIKI WYRAŻONO JAKO % KONTROLI (PROLIFERACJĘ KOMÓREK NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). * P<0,05; ## P<0,01; *** P<0,001 VS. ODPOWIEDNIA KONTROLA.	111
RYCINA 32. WEWNĄTRZKOMÓRKOWY POZIOM RFT W KOMÓRKACH LINII K-562 PO INKUBACJI (60 MIN., 37°C) Z SUPERNATANTAMI KKCz (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (10 µM). DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 5 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 25). UZYSKANE WYNIKI WYRAŻONO JAKO % KONTROLI (POZIOM RFT W KOMÓRKACH NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). */# P<0,05; ** P<0,01 W PORÓWNIANIU Z ODPOWIEDNIĄ KONTROLĄ.	112
RYCINA 33. USZKODZENIA DNA, MIERZONE JAKO PROCENTOWA ZAWARTOŚĆ DNA W „OGONIE”, W KOMÓRKACH LINII K-562 UPREDNIO INKUBOWANYCH (60 MIN., 37°C) Z SUPERNATANTAMI KKCz (5%, 20%). DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 3 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 15). ** P<0,01; *** P<0,001 VS. KONTROLA (KOMÓRKI NIETRAKTOWANE).....	113
RYCINA 34. REPREZENTATYWNE ZDJĘCIA KOMET DNA KOMÓREK LINII K-562 PODDANYCH DZIAŁANIU SUPERNATANTÓW KKCz. ZDJĘCIA WYKONANO UŻYWAJĄC MIKROSKOPU FLUORESCENCYJNEGO FIRMY NIKON MODEL ECLIPSE E400 WYPOSAŻONEGO W KAMERĘ PROGRes MF COOL FIRMY JENOPTIK (AUTORSTWA K. CZUBAK-PROWIZOR).	113
RYCINA 35. AKTYWNOŚĆ KASPAZY-3/7 (A) I KASPAZY-9 (B) W KOMÓRKACH LINII K-562 ORAZ PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK INKUBOWANYCH W OBECNOŚCI INHIBITORA KASPAZ Z-VAD-FMK (C) TRAKTOWANYCH SUPERNATANTAMI POCHODZĄCYMI Z KKCz (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (10 µM). DANE UZYSKANE PODCZAS POMIARU PRZEŻYWALNOŚCI PRZEDSTAWIONO JAKO % KONTROLI (ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO JAKO 100%). WYNIKI Z 3 NIEZALEŻNYCH EKSPERYMENTÓW PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ ± SD (N = 15). */# P<0,05; ***/### P<0,001 VS. ODPOWIEDNIA KONTROLA.	114
RYCINA 36. PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK LINII A2780 (A) ORAZ PC-3 (B) PO 24-GODZINNEJ INKUBACJI Z SUPERNATANTAMI (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (ODPOWIEDNIO 5 ORAZ 10 µM). WYKRES PRZEDSTAWIA WARTOŚCI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 3 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 15). UZYSKANE WYNIKI PRZEDSTAWIONO JAKO % KONTROLI (ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 VS. KONTROLA (KOMÓRKI NIETRAKTOWANE).	115
RYCINA 37. PRZEŻYWALNOŚĆ KOMÓREK LINII LoVo (A), MCF7 (B) ORAZ MCF-10A (C) PO 24-GODZINNEJ INKUBACJI Z SUPERNATANTAMI (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (ODPOWIEDNIO 25, 25 ORAZ 40 µM). WYKRES PRZEDSTAWIA WARTOŚCI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 3 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 15). UZYSKANE WYNIKI PRZEDSTAWIONO JAKO % KONTROLI (ŻYWOTNOŚĆ KOMÓREK NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). */# P<0,05; ***/### P<0,001 W PORÓWNIANIU DO ODPOWIEDNIEJ KONTROLI; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 VS. KONTROLA (KOMÓRKI NIETRAKTOWANE).....	116
RYCINA 38. PROLIFERACJA KOMÓREK LINII LoVo (A), MCF7 (B) ORAZ MCF-10A (C) PO 24-GODZINNEJ INKUBACJI Z SUPERNATANTAMI (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (CISPT; A, B: 25 µM; C: 40 µM). DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 3 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 15). UZYSKANE WYNIKI WYRAŻONO JAKO % KONTROLI (PROLIFERACJĘ KOMÓREK NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). */# P<0,05; ***/### P<0,001 VS. ODPOWIEDNIA KONTROLA.	118
RYCINA 39. WEWNĄTRZKOMÓRKOWY POZIOM RFT W KOMÓRKACH LINII LoVo (A), MCF7 (B) ORAZ MCF-10A (C) PO INKUBACJI (60 MIN., 37°C) Z SUPERNATANTAMI KKCz (5%) Z DODATKIEM LUB BEZ CISPT (CISPT; A, B: 25 µM; C: 40 µM). DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 5 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 25). UZYSKANE WYNIKI WYRAŻONO JAKO % KONTROLI (POZIOM RFT W KOMÓRKACH NIETRAKTOWANYCH PRZYJĘTO ZA 100%). */# P<0,05; ***/### P<0,001 W PORÓWNIANIU Z ODPOWIEDNIĄ KONTROLĄ; *** P<0,001 VS. KONTROLA (KOMÓRKI NIETRAKTOWANE).	119
RYCINA 40. USZKODZENIA DNA, MIERZONE JAKO PROCENTOWA ZAWARTOŚĆ DNA W „OGONIE”, W KOMÓRKACH LINII LoVo (A), MCF7 (B) ORAZ MCF-10A (C) UPREDNIO INKUBOWANYCH (60 MIN., 37°C) Z SUPERNATANTAMI POCHODZĄCYMI Z KKCz (5%). DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNICH ARYTMETYCZNYCH ± SD Z 3 NIEZALEŻNYCH DOŚWIADCZEŃ (N = 15). *	

p<0,05; ** p<0,01 vs. KONTROLA (KOMÓRKI NIETRAKTOWANE).	120
RYCINA 41. REPREZENTATYWNE ZDJĘCIA KOMET DNA KOMÓREK LINII LoVo, MCF7 ORAZ MCF-10A PODDANYCH DZIAŁANIU SUPERNATANTÓW POCHODZĄCYCH Z KKCZ. ZDJĘCIA WYKONANO UŻYWAJĄC MIKROSKOPU FLUORESCENCYJNEGO FIRMY NIKON MODEL ECLIPSE E400 WYPOSAŻONEGO W KAMERĘ PROGRes MF COOL FIRMY JENOPTIK (AUTORSTWA K. CZUBAK-PROWIZOR).	120
RYCINA 42. STĘŻENIE GRUP TIOLOWYCH [μ MOL/L OSOCZA] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. # p<0,05; *** p<0,001; n = 30 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).....	121
RYCINA 43. STĘŻENIE GRUP KARBONYLOWYCH [NMOL/MG BIAŁEK OSOCZA] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. # p<0,05; *** p<0,001; n = 33 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).....	122
RYCINA 44. STĘŻENIE 3-NT [NMOL/MG BIAŁEK OSOCZA] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. # p<0,05; *** p<0,001; n = 25 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).....	122
RYCINA 45. STĘŻENIE KOŃCOWYCH PRODUKTÓW ZAAWANSOWANEJ GLIKACJI (AGE) [μ G/ML OSOCZA] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. # p<0,05; ***/### p<0,001; n = 30 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP). ...	123
RYCINA 46. STĘŻENIE TBARS [NMOL/ML OSOCZA] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. # p<0,05; ## p<0,01; *** p<0,001; n = 31 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).....	124
RYCINA 47. CAŁKOWITY POTENCJAŁ ANTYOKSYDACYJNY (CPA) OSOCZA [MM JEDNOELEKTRONOWYCH RÓWNOWAŻNIKÓW TROLOXU] PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. */# p<0,05; *** p<0,001; n = 25 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).	124
RYCINA 48. AKTYWNOŚĆ DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ (SOD) [WSPÓŁCZYNNIK ZAHAMOWANIA; %] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. * p<0,05; ** p<0,01; n = 25 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).....	125
RYCINA 49. AKTYWNOŚĆ TRANSFERAZY GLUTATIONOWEJ (GST) [MU/ML] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. # p<0,05; *** p<0,001; n = 29 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).....	126
RYCINA 50. ZEWNĄTRZKOMÓRKOWA AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY MLECZANOWEJ (LDH) [U] U PACJENTÓW Z AML (PRZED I PO PRZETOCZENIU SKŁADNIKÓW KRWI) ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ. DANE PRZEDSTAWIONO W POSTACI ŚREDNIEJ ARYTMETYCZNEJ \pm SEM. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n = 25 (GRUPA KONTROLNA); n = 27 (KKCz); n = 25 (KKP).	126

18. Dorobek naukowy

Prace eksperymentalne

1. A. Antosik, **K. Czubak**, A. Gajek, A. Marczak, R. Glowacki, K. Borowczyk, H. M. Zbikowska “*Influence of Pre-Storage Irradiation on the Oxidative Stress Markers, Membrane Integrity, Size and Shape of the Cold Stored Red Blood Cells*” *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2015; 42:140-148. DOI: 10.1159/000371596.
70 pkt MNiSW; IF 3,000 (5-letni IF 2,179).
2. **K. Czubak**, A. Antosik, N. Cichon, H. M. Zbikowska “*Vitamin C and Trolox decrease oxidative stress and hemolysis in cold-stored human red blood cells*” *Redox Report*, 2017; 22(6):445-450. DOI: 10.1080/13510002.2017.1289314.
70 pkt MNiSW; IF 1,963 (5-letni IF 2,066).
3. A. Antosik, **K. Czubak**, N. Cichon, P. Nowak, H. M. Zbikowska „*Vitamin E Analogue Protects Red Blood Cells against Storage-Induced Oxidative Damage*” *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2018; 45:347-354. DOI: 10.1159/000486605.
70 pkt MNiSW; IF 3,000 (5-letni IF 2,179).
4. M. Szejka-Arendt, **K. Czubak-Prowizor**, A. Macieja, T. Popławski, A. K. Olejnik, I. Pawlaczyk-Graja, R. Gancarz, H. M. Zbikowska “*Polyphenolic-polysaccharide conjugates from medicinal plants of Rosaceae/Asteraceae family protect human lymphocytes but not myeloid leukemia K562 cells against radiation-induced death*” *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 156:1445-1454. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.186.
100 pkt MNiSW; IF 5,162 (5-letni IF 5,137).
5. **K. Czubak-Prowizor**, J. Rywaniak, H. M. Zbikowska “*Red blood cell supernatant increases activation and agonist-induced reactivity of blood platelets*” *Thrombosis Research*, 2020; 196:543-549. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.10.023.
100 pkt MNiSW; IF 2,869 (5-letni IF 2,621).

Prace przeglądowe

1. **K. Czubak**, H. M. Zbikowska „*Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów*”. *Annales Academiae Medicae Silesiensis* 2014, 68, 4; 245-254.
2. **K. Czubak**, H. M. Zbikowska „*Krwinki czerwone w transfuzjologii – postępy badań proteomicznych*” - rozdział w recenzowanej monografii naukowej pt. „*Wybrane zagadnienia z zakresu medycyny i nauk pokrewnych*”. Wydawnictwo TYGIEL. 2016, 85-106. ISBN 978-83-65598-29-5.

3. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Stres oksydacyjny w przechowywanych składnikach krwi i po przetoczeniu koncentratu krwinek czerwonych w wybranych grupach biorców*” - rozdział w recenzowanej monografii naukowej pt. „*Doniesienia naukowe z zakresu medycyny i nauk pokrewnych*”. Wydawnictwo TYGIEL. 2017, 132-152. ISBN 978-83-65598-48-6.

Udział w sympozjach i konferencjach naukowych (komunikaty zjazdowe)

1. A. Antosik, **K. Czubak** „*Wpływ Troloxu na zmiany oksydacyjne zachodzące w koncentratkach krwinek czerwonych podczas ich przechowywania*” I Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych „*WKRACZAJĄC W ŚWIAT NAUKI 2014*”. 11-12.09.2014, Wrocław. Poster.
2. **K. Czubak**, A. Antosik „*Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w napromienianych krwinkach czerwonych przeznaczonych do transfuzji*” I Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych „*WKRACZAJĄC W ŚWIAT NAUKI 2014*”. 11-12.09.2014, Wrocław. Poster.
3. **K. Czubak** „*Effect Of Mannitol On Oxidative Changes In Stored Red Blood Cells For Transfusion*” XVI National Academic Seminar of Biotechnology Students & VI International Conference of Biotechnology Students. 21-23.11.2014, Łódź. Poster.
4. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Zmiany morfologiczne krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji zachodzące podczas ich przechowywania w warunkach in vitro*” VII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2015 „*Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju*”. 21-22.03.2015, Lublin. Poster.
5. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Analiza proteomiczna w badaniach przechowywanych krwinek czerwonych przyszłością transfuzjologii*” VII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2015 „*Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju*”. 21-22.03.2015, Lublin. Prezentacja ustna.
6. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Rola żelaza niezwiązanego z transferyną (NTBI) w uszkodzeniach oksydacyjnych krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji*” IV Konferencja Biologii Molekularnej. 26-28.03.2015, Łódź. Poster.
7. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Wpływ warunków przechowywania na właściwości biochemiczne krwinek czerwonych*” I Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. 20-22.04.2015, Łódź. Poster.
8. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Trolox protects human red blood cells against morphological changes occurring during in vitro storage*” IV International Conference of Biophysics Students. 22-24.05.2015, Kraków. Poster.
9. **K. Czubak** „*Application of flow cytometry in erythrocytes-derived microparticles (EMPs) studies*” XVII National Academic Seminar of Biotechnology Students & VII International Conference of Biotechnology Students. 20-22.11.2015, Poznań. Poster.
10. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Przetaczanie koncentratów krwinek czerwonych u pacjentów chorych na nowotwory*” II Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESCULAP. 05-06.12.2015, Lublin. Poster.

11. **K. Czubak** „Ryzyko wystąpienia niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych a wiek przechowywanych krwinek czerwonych” VIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2016 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”. 12-13.03.2016, Lublin. Prezentacja ustna.
12. **K. Czubak** „Zmiany zachodzące w procesie starzenia krwinek czerwonych w warunkach *in vivo*” V Konferencja Biologii Molekularnej. 07-09.04.2016, Łódź. Poster.
13. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „Wpływ supernatantów z koncentratów krwinek czerwonych na agregację płytek krwi” II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. 12-14.05.2016, Łódź. Poster.
14. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska “*Accumulation of extracellular hemoglobin, heme and iron in the supernatants of packed red blood cells for transfusion*” V International Conference of Biophysics Students. 20-22.05.2016, Kraków. Poster.
15. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Supernatants from stored red blood cell (RBC) units inhibit platelets adhesion*” VIII International Conference of Biotechnology Students & XVIII National Academic Seminar of Biotechnology Students & I BioChemMed Session. 25-27.11.2016, Gdańsk. Poster.
16. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Cytokiny prozapalne w przechowywanych składnikach krwi*” III Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP. 03.12.2016, Lublin. Poster.
17. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Wpływ nadsączu (supernatantu) z przechowywanych koncentratów krwinek czerwonych na żywotność komórek jednojądrzastych krwi obwodowej*” VI Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych I Ścisłych PUZZEL. 01-02.04.2017, Wrocław. Poster.
18. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Hemoglobina jako źródło reaktywnych form tlenu*” VI Konferencja Biologii Molekularnej. 06-08.04.2017, Łódź. Poster.
19. **K. Czubak**, M. Kliber, H. M. Żbikowska „*Ocena poziomu wybranych parametrów w supernatantach przechowywanych koncentratów krwinek czerwonych*” III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. 11-12.05.2017, Łódź. Poster.
20. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Przetaczanie krwinek czerwonych jako czynnik ryzyka retinopatii i przewlekłej choroby płuc u wcześniaków*” VII Konferencja Biologii Molekularnej. 12-14.04.2018, Łódź. Poster.
21. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska “*Supernatants from stored red blood cell units activate blood platelets*” 4th International Conference of Cell Biology. 11-12.05.2018, Kraków. Poster.
22. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska „*Właściwości prokoagulacyjne przechowywanych koncentratów krwinek czerwonych*” IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen. 24-25.05.2018, Łódź. Poster.
23. **K. Czubak**, H. M. Żbikowska “*Low molecular weight compounds which accumulate in red blood cell units increase the reactivity of blood platelets*” 3rd Congress BIO2018 “Through interdisciplinary approach into new solutions”, 51st Meeting of the Polish Biochemical Society and 14th Conference of the Polish Society for Cell Biology. 18-21.09.2018, Gdańsk. Poster.

24. **K. Czuba**k, A. Olejnik, H. Żbikowska “*Influence of plant polyphenolic-polysaccharide complex on ionizing radiation-induced cellular responses in normal and cancer cell lines*” 44th FEBS Congress “From molecules to living systems”. 06-11.07.2019, Kraków. Poster.

Staż zagraniczne

1. 01.05. – 31.07.2017: Staż naukowy w ramach programu ERASMUS+, Department of Biology, University of A Coruña, A Coruña (Hiszpania).

Szkolenia i warsztaty

1. „*Komercjalizacja i finansowanie własnego biznesu oraz własność intelektualna w pracy na uczelni wyższej*” szkolenie przeprowadzone przez Marię Przybylska-Karczemską i dr Dariusza Trzmielaka w dn. 12.12.2013 r. w Łodzi.
2. „*Warsztaty Konfokalnej Mikroskopii Ramanowskiej, AFM, TERS*”, Politechnika Łódzka, Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej, Łódź - 17-19.09.2014.
3. „*Application of flow cytometry in molecular oncology*”- Warsztaty poświęcone cytometrii przepływowej w onkologii molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny - Bastion, Warszawa - 15.10.2014.
4. „*Podstawy techniki immunoenzymatycznej ELISA – kurs praktyczny*”, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 01.12.2014.
5. „*Medycyna molekularna – techniki i aplikacje praktyczne*”, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 08-12.12.2014.
6. „*Analiza proteomiczna krwinki czerwonej – przyszłość transfuzjologii i hematologii?*”, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 20-21.01.2015.
7. „*Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach krwinek czerwonych*”, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 16-17.02.2015.
8. „*Warsztaty pt. Krioprezervacja – nowoczesne sposoby transportu, zamrażania i przechowywania prób*”, Bioanalytic, Łódź - 18.02.2015.
9. „*Techniki rozdziału i immunodetekcji białek*”, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 09-11.03.2015.
10. „*Niedokrwistości hemolityczne wrodzone i nabyte – diagnostyka i leczenie*”, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 12-13.03.2015.
11. „*Elektroforeza dwukierunkowa 2-DE metoda i zastosowanie*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 24-26.11.2015.
12. „*Podstawy chromatografii. Wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) z uwzględnieniem peptydów i białek*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 13-15.10.2015.
13. „*Przepływ informacji genetycznej od genu do białka*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 18.02.2016.

14. „*Rola mikroRNA w procesie nowotworzenia*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa - 15.03.2016.
15. *Szkolenie z zakresu obsługi cytometru przepływowego Partec CyFlow® Cube 6; Sysmex Polska Sp. z o.o., Łódź - 29.01.2016.*
16. „*Podstawy immunologii*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Pracownia Cytometrii Przepływowej, Warszawa - 19-20.10.2016.
17. „*Metody immunochemiczne w praktyce laboratoryjnej*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Warszawa - 08-10.11.2016.
18. „*Podstawy cytometrii przepływowej – zastosowanie w diagnostyce*”, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Pracownia Cytometrii Przepływowej, Warszawa - 20-23.03.2017.
19. „*Rozwój kariery naukowej doktorantów poprzez granty Narodowego Centrum Nauki*”, II Dzień Doktoranta UŁ, Łódź - 21.05.2018.
20. „*Cell Culture, Stem Cells & Transfection*”, Thermo Fisher Scientific Polska, Centrum Szkoleniowo-Konferencyjne Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź - 17.05.2018.
21. „*Light up your Research - Molecular Biology Seminars*”, Thermo Fisher Scientific Polska, Hotel Ambassador Premium, Łódź - 03.10.2018.

Działalność popularyzująca naukę

1. Członek Wydziałowej Rady Samorządu Studentów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w roku akademickim 2011/2012.
2. Aktywny Członek Sekcji Biochemicznej Koła Naukowego Biologów UŁ od roku akademickiego 2014/15 – obecnie. Aktywny członek Studenckiego Koła Naukowego Młodych Biofizyków UŁ w roku akademickim 2015/16.
3. Czynny udział w warsztatach organizowanych w ramach akcji „Uniwersytet Łódzki dla Dzieci” w roku akademickim 2014/2015 oraz 2015/16.
4. Czynny udział w „Nocy Biologów” na Wydziale BiOŚ – w latach 2014/15, 2015/16, 2016/17, 2017/18.
5. Czynny udział w Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki w Łodzi – w latach 2014/15, 2015/16, 2016/17.
6. Sprawowanie opieki nad praktykantami odbywającym nieobligatoryjne praktyki studenckie.
7. Organizacja konferencji naukowych:
 - I Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen - 20-22.04.2015*
 - II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen - 12-14.05.2016*
 - III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen - 11-12.05.2017*
 - IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen - 24-25.05.2018*
 - V Konferencja Biologii Molekularnej - 07-09.04.2016*
 - VI Konferencja Biologii Molekularnej - 06-08.04.2017*
8. Aktywne uczestnictwo w promocji studiów doktoranckich Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska w ramach II Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego (21.05.2018).

Projekty

1. Wykonawca w projekcie pt. „*Nowy produkt z krwiociągu lekarskiego o innowacyjnym działaniu radioochronnym*” Projekt Inkubator Innowacyjności+ (01.12.2017–30.11.2018). Kod projektu: B1713500000748000.