



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

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-nitracynny, co może mieć istotne znaczenie w przebiegu klinicznym choroby i zastosowanym leczeniu (chemioterapia).

Kamila Czubal-Provizor

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 day 1 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).

Kamila Czubaj-Rawicz