

**POLITECHNIKA WROCŁAWSKA**

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

# **ROZPRAWA DOKTORSKA**

mgr inż. Katarzyna Gałęcka

**Fizjologiczne parametry płytek krwi w procesie  
hemodializy zwierząt i ich zmiany wywołane  
promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR)**

**Promotorzy**

Prof. dr hab. Małgorzata Komorowska

Dr hab. inż. Jerzy Detyna, prof. uczelni

Wrocław 2023

Chciałabym bardzo serdecznie podziękować wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy i stanowili nieocenioną pomoc w prowadzeniu badań.

Przede wszystkim ogromnie dziękuję Pani Prof. dr hab. Małgorzacie Komorowskiej i dr inż. Tomaszowi Walskiemu, za wszystkie konsultacje, dyskusje, cenne wskazówki i rady oraz dostarczane wsparcie we wszystkich aspektach pracy naukowej. Ponadto Pani Prof. dr hab. Małgorzacie Komorowskiej bardzo dziękuję za Jej serdeczność i dostarczaną inspirację i motywację do działań.

Osobne i niezwykle ważne podziękowania składam dr. hab. inż. Jerzemu Detynie, prof. uczelni za czas poświęcony tej rozprawie, przeprowadzone analizy i dyskusje, ale przede wszystkim za okazane pokłady cierpliwości i wytrwałości, bez których niniejsza rozprawa nie miałaby swojego finału.

Pragnę podziękować moim współpracownikom, a w szczególności dr n. wet. Jolancie Bujok i dr inż. Karolinie Grzeszczuk-Kuć za wszelką pomoc i dobrą atmosferę podczas prowadzenia zabiegów hemodializy oraz prac laboratoryjnych.

Swoje podziękowania kieruje również dla Pana mgr inż. Marka Sudera za jego udział w tworzeniu układu doświadczalnego.

*Niniejszą pracę dedykuję Moim Najbliższym*

## STRESZCZENIE

Jedną z metod oczyszczania krwi ze szkodliwych produktów przemiany materii i toksyn jest hemodializa. W technice tej stosowane jest krążenie pozaustrojowe, które skutkuje uszkodzeniem elementów morfotycznych krwi, zaburzeniami układu krzepnięcia oraz prowadzi do powstawania stanu zapalnego. Konsekwencją tych zaburzeń są powikłania, które wymagają prowadzenia rozszerzonej diagnostyki i leczenia, obniżając efektywność stosowanych terapii i potencjalnej przeżywalności pacjentów.

Niniejsza praca była częścią projektu WROVASC, którego koordynatorem był Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu. W projekcie tym przedmiotem badań był wpływ krążenia pozaustrojowego na elementy morfotyczne krwi oraz potencjalne korzyści z zastosowania promieniowania z zakresu bliskiego podczerwieni (NIR) jako narzędzia ochronnego. Moja praca skupiała się na jednym z elementów jakim są płytki krwi. Celem naukowym mojej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) na płytki krwi podczas krążenia pozaustrojowego w hemodializie. Realizacja tego celu obejmowała opracowanie i sprawdzenie autorskiej metody badania aktywności płytek krwi opierającej się na ocenie płynności błony z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Metodę tę zastosowałam razem z technikami pomiaru zdolności płytek do agregacji (agregometria impedancyjna) do oceny stanu ich aktywności w przeprowadzonej serii zabiegów hemodializy zwierząt poddawanych obustronnej nefrektomii. W trakcie hemodializy u połowy zwierząt krew podczas krążenia pozaustrojowego została poddana naświetlaniu promieniowaniem NIR. Przeprowadzenie 100 zabiegów hemodializy pozwoliło na przeprowadzenie analiz statystycznych potrzebnych do otrzymanych wyników dla badanych parametrów.

Moje badania wykazały, że zastosowana metoda badania płynności błony płytek krwi wykazuje korelację ze stanem aktywności i jest przydatna do oceny jej zmian wywołanych w procesie hemodializy.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że naświetlanie promieniowaniem NIR prowadzi do zmniejszenia aktywacji płytek krwi, które charakteryzowały się większą zdolnością agregacyjną. Obserwowalnym skutkiem zastosowania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni była znaczna redukcja powstawania skrzeplin na powierzchni membrany dializatora, co wskazuje na zahamowanie procesów aktywacyjnych.

Uzyskane eksperymentalnie wyniki potwierdziły hipotezę postawioną w niniejszej dysertacji, że promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni wykazuje działanie ochronne na płytki krwi podczas krążenia pozaustrojowego w hemodializie.

## SUMMARY

One of the methods used to purify the blood of harmful metabolic products and toxins is hemodialysis. This technique uses extracorporeal circulation, which results in damage to the morphotic elements of the blood, disorders of the coagulation system, and leads to inflammation. The consequence of these disorders are complications requiring extended diagnostics and treatment reducing the effectiveness of the therapies used and the potential survival of patients.

This work was part of the WROVASC project, which was coordinated by the Regional Specialist Hospital in Wrocław. In this project, the subject of the research was the impact of extracorporeal circulation on blood morphotic elements and the potential benefits of using near infrared radiation (NIR) as a protective tool. My work focused on one of the elements, which are platelets. The scientific objective of my doctoral dissertation was to investigate the effect of near-infrared (NIR) radiation on platelets during extracorporeal circulation in hemodialysis. The implementation of this goal included the development and testing of a proprietary method for testing platelet activity based on the assessment of membrane fluidity using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. I used this method in conjunction with the techniques for measuring platelet aggregate ability (impedance aggregometry) to assess the state of their activity in a series of hemodialysis procedures in animals undergoing bilateral nephrectomy. During hemodialysis, blood was exposed to NIR radiation in half of the animals during extracorporeal circulation. Conducting 100 hemodialysis treatments allowed for statistical analyzes necessary to obtain the results for the tested parameters.

My research has shown that the method used to test the fluidity of the platelet membrane shows correlations with the state of activity and is useful in assessing its changes caused by hemodialysis. The experiments carried out showed that irradiation with NIR radiation led to a reduction in platelets activation, which were characterized by a greater aggregation capacity. An observable effect of the use of near-infrared radiation was a significant reduction in the formation of thrombi on the surface of the dialyzer membrane, which indicates the inhibition of activation processes.

The experimental results confirmed the hypothesis put forward in this dissertation that near-infrared radiation has a protective effect on platelets during extracorporeal circulation in hemodialysis.

## Spis treści

Spis rysunków .....	7
Spis tabel .....	11
Wykaz najważniejszych skrótów i oznaczeń .....	13
1. Wprowadzenie .....	17
2. Przegląd stanu wiedzy .....	20
2.1. Płytki krwi, ich funkcja i własności .....	20
2.2. Aktywacja i adhezja płytek do syntetycznej powierzchni .....	23
2.2.1. Mechanizm adhezji .....	23
2.2.2. Adhezja płytek do sztucznych powierzchni .....	33
2.2.3. Szkło jako specyficzna powierzchnia .....	39
2.3. Aktywacja a płynność błony plazmatycznej płytek .....	40
2.3.1. Zmiany strukturalne zachodzące w czasie aktywacji płytek krwi .....	40
2.3.2. Zmiany błonowe indukowane agonistami i ich znaczenie .....	54
2.3.3. Zmiany w stanach patologicznych .....	57
2.3.4. Metody badań płynności błony .....	57
2.4. Hemodializa jako przykład zabiegu krążenia pozaustrojowego .....	59
2.4.1. Oddziaływanie z błoną dializatora .....	62
2.4.2. Aktywacja koagulacji i płytek .....	62
2.5. Wpływ promieniowania o małej mocy na płytki krwi .....	64
2.5.1. Promieniowanie z zakresu spektralnego czerwonego .....	64
2.5.2. Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) .....	72
3. Cel pracy i hipoteza badawcza .....	77
4. Materiały i metody badań .....	79
4.1. Przebieg doświadczeń na zwierzętach .....	79
4.2. Preparatyka osocza bogatopłytkowego (Platelet Rich Plasma, PRP) z krwi pełnej .....	81
4.3. Naświetlanie NIR .....	81
4.4. Ocena własności agregacyjnych płytek w krwi pełnej metodą impedancyjną .....	85
4.5. Autorska metoda pomiaru agregacji płytek z wykorzystaniem znacznika spinowego .....	86
4.5.1. Podstawy metody .....	86
4.5.2. Widmo i jego składowe .....	87

4.5.3. Dynamika zmian. Wyznaczane parametry .....	89
4.5.4. Weryfikacja metody. Porównanie z innymi technikami .....	93
4.5.5. Weryfikacja metody. Badanie płytek o zmienionym stanie aktywności.....	97
4.6. Metody statystyczne wykorzystane do analizy wyników badań .....	100
5. Wyniki badań.....	103
5.1. Ocena wyników uzyskanych badań z wykorzystaniem analizy skupień.....	103
5.2. Analiza zmian zachodzących podczas trwania hemodializy uwzględniająca miejsce i czas pobrania krwi na podstawie wyników wszystkich dializ (10 zabiegów) i bez rozróżnienia na grupę kontrolną i naświetlaną .....	105
5.3. Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną występujących w trakcie pojedynczej dializy (zmiany w czasie) na podstawie wyników wszystkich 10 zabiegów z uwzględnieniem miejsca pobrania krwi, oddzielnie przed (B) i za (A) dializatorem.....	108
5.4. Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną występujących w wraz z prowadzeniem kolejnych dializ (zmiany w czasie od 1. do 10. zabiegu) na podstawie wyników otrzymanych w poszczególnych sesjach niezależnie od czasu i miejsca pobrania krwi (łącznie przed (B) i za (A) dializatorem).....	113
5.5. Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną w przebiegu zmian zachodzących wraz prowadzeniem kolejnych dializ (zmiany w czasie od 1. do 10. zabiegu) w zależności od miejsca pobrania krwi, oddzielnie przed (B) i za (A) dializatorem.....	116
6. Dyskusja wyników .....	124
7. Wnioski końcowe i perspektywa dalszych badań .....	129
Dorobek naukowy .....	131
Piśmiennictwo .....	136
Załączniki .....	149

## Spis rysunków

Rys. 1. Płytki krwi i ich zróżnicowane funkcje w patofizjologicznych procesach [36]. .....	21
Rys. 2. Działanie aparatu do hemodializy. Obiegi: czerwony - krwi; niebieski - płynu dializacyjnego. ....	60
Rys. 3. Układ do hemodializy i wskazanie (pomarańczowe strzałki) licznych bodźców mających wpływ na niekompatybilność stosowanej terapii [12]. ....	61
Rys. 4. Schemat układu eksperymentalnego (dializacyjnego) podczas pobierania prób. ....	80
Rys. 5. Schemat ilustrujący czas i miejsce pobrania próbek. ....	80
Rys. 6. Napromiennik służący do uzyskiwania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni. ....	82
Rys. 7. Konstrukcja napromiennika NIR. ....	82
Rys. 8. Napromienniki NIR w trakcie zabiegu hemodializy umocowane prostopadle do dializatora. ....	83
Rys. 9. Rozkład gęstości mocy promieniowania NIR na powierzchni membrany dializacyjnej. Źródło: na podstawie [124 i 127]. ....	84
Rys. 10. Charakterystyka widmowa źródła promieniowania, dializatora (A) i drenów (B). Źródło: na podstawie [124]. ....	84
Rys. 11. Widmo: 14-sto dniowe płytki wyizolowane metodą powtarzanego wirowania i płukania znakowane sondą 16-DSA. ....	87
Rys. 12. Widmo: roztwór albuminy, do którego także została wprowadzona sonda 16-DSA. ....	88
Rys. 13. Widmo: płytki w PRP z wprowadzoną sondą 16-DSA. ....	88
Rys. 14. Zestawienie (nałożenie) widm pokazanych powyżej (opis w tekście). ....	89
Rys. 15. Amplituda sygnału niskopolewego $h_{+1}$ i amplituda sygnału centralnego $h_0$ . ....	89
Rys. 16. Kinetyka zmian wyznaczanego z widm znacznika 16-DSA parametru $h_{+1}/h_0$ w czasie kontaktu płytek ze szkłem. ....	90
Rys. 17. Przykład zmian w $Ca^{2+}$ i zarejestrowanych przez intensywność fluorescencji ludzkich płytek krwi inkubowanych z prokainą przed dodaniem EDTAK2 i ADP. Przedziały czasowe, w których do pożywki inkubacyjnej dodawano EDTAK2 i ADP, zaznaczono odpowiednio ↓ i ↑. Dane wygładzone przy użyciu oprogramowania Perkin-Elmer LS50B [118]. ....	91

Rys. 18. Zmiany stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego zarejestrowane w czasie aktywacji płytek zestawione ze zmianami rejestrowanymi z widm znacznika 16-DSA w czasie kontaktu płytek ze szkłem.....	91
Rys. 19. Idea wyznaczenia parametrów określających aktywność badanych komórek poprzez dopasowanie funkcji wielomianowej (linia niebieska, kreska-punkt) i linii prostej (linia czerwona, kreskowa).....	92
Rys. 20. Ta sama płytka w różnych stadiach jej przemiany z formy sferoidalnej tuż po zetknięciu z podłożem (a) do postaci w pełni rozłożonej (h). Czasy wykonywania mikrofotografii to 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8 i 13 minut dla etapów a-h. Widoczne struktury obejmują pseudopodia (Ps), ciała gęste (DB) i kratery (Cr) [5]. .....	93
Rys. 21. Etapy adhezji płytek; skaningowy mikroskop elektronowy: płytka spoczynkowa o kształcie dyskooidalnym, tuż po zetknięciu z podłożem (a), wczesna postać aktywacji, zmiana kształtu i emisja pseudopodiów – forma 1 (b), późna forma aktywacji, płytka rozłożona, przylegająca do szkła, całkowicie rozpostarta – forma 2 (c) [ <a href="http://www.platelet-research.org">http://www.platelet-research.org</a> , dostęp: 30.03.2021].....	93
Rys. 22. Adhezja płytek do powierzchni szkła: zmiana kształtu i emisja pseudopodiów – forma 1; mikroskop optyczny z kontrastem fazowym i obiektywem immersyjnym ( $\times 100/1.25$ ). .....	94
Rys. 23. Adhezja płytek do powierzchni szkła: późna postać, płytka rozłożona, przylegająca do szkła, całkowicie rozpostarta – forma 2; mikroskop optyczny z kontrastem fazowym i obiektywem immersyjnym ( $\times 100/1.25$ ). .....	94
Rys. 24. Zmiany kształtu komórek w czasie aktywacji powierzchniowej (zestawienie czasowe widm i zdjęć). .....	95
Rys. 25. Zestawienie kinetyk parametru $h+1/h_0$ wyznaczanego z widm znacznika 16-DSA uzyskanych za pomocą kapilary szklanej i kapilary z tworzywa sztucznego TPX. ....	97
Rys. 26. Zestawienie kinetyk parametru $h+1/h_0$ wyznaczanego z widm znacznika 16-DSA uzyskanych dla produktu bogatopłytkowego i produktu bogatopłytkowego z dodatkiem EDTA.....	98
Rys. 27. Zestawienie zmian przybieranych kształtów przez płytki w kontakcie ze szkłem obserwowane pod mikroskopem (odsetek komórek w formie z pseudopodiami – rysunek wyżej i w postaci całkowicie rozpostartej – rysunek niżej) dla produktu bogatopłytkowego i produktu bogatopłytkowego z dodatkiem EDTA. ....	99



Rys. 28. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. ....	106
Rys. 29. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. ....	106
Rys. 30. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana przed dializatorem (B). ....	109
Rys. 31. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana za dializatorem (A). ....	110
Rys. 32. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana przed dializatorem (B). ....	110
Rys. 33. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana za dializatorem (B). ....	111
Rys. 34. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana przed dializatorem (B). ....	111
Rys. 35. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana za dializatorem (A). ....	112
Rys. 36. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ. ....	115
Rys. 37. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ. ....	115
Rys. 38. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ. ....	116
Rys. 39. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana przed dializatorem. ....	118
Rys. 40. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana przed dializatorem. ....	119
Rys. 41. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana przed dializatorem. ....	122

Rys. 42. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbka pobrana za dializatorem.....	123
Rys. 43. Zdjęcia dializatorów dla prób kontrolnych (powyżej; bez naświetlania) oraz naświetlanych promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR; poniżej).....	126

## Spis tabel

Tab. 1. Strategie minimalizujące skutki hemo-niekompatybilności w hemodializach [10].	18
Tab. 2. Agoniści, ligandy, receptory istotne z punktu widzenia funkcjonowania płytek [40].	22
Tab. 3. Wyniki uogólnionej analizy skupień dla grupy kontrolnej (K).	103
Tab. 4. Wyniki uogólnionej analizy skupień dla grupy NIR.	103
Tab. 5. Wyniki testu niezależności klasyfikowanych skupień dla grupy kontrolnej (K).	103
Tab. 6. Wyniki testu niezależności klasyfikowanych skupień dla grupy NIR.	104
Tab. 7. Wyniki uogólnionej analizy skupień dla całej zbiorowości po odjęciu owiec 4, 5 i 12.	104
Tab. 8. Wyniki testu niezależności klasyfikowanych skupień dla badanej zbiorowości statystycznej po dojęciu owiec 4, 5, 12.	104
Tab. 9. Standaryzowana odległość między skupieniami (domyślnie skupienie 1 – K, skupienie 2 – NIR).	104
Tab. 10. Wyniki jednoczynnikowej ANOVA z poprawką Welcha. Czynniki: punkty pomiarowe podczas dializy.	105
Tab. 11. Wyniki testu post-hoc Tukeya dla zmiennej ADP (AUC). Czynniki: punkty pomiarowe podczas dializy.	107
Tab. 12. Wyniki testu post-hoc Tukeya dla zmiennej EPR-nas. Czynniki: punkty pomiarowe podczas dializy.	107
Tab. 13. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA przed dializatorem. Czynniki: K/NIR; punkty pomiarowe podczas dializy.	108
Tab. 14. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA za dializatorem. Czynniki: K/NIR; punkty pomiarowe podczas dializy.	108
Tab. 15. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA z poprawką Welcha. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ.	113
Tab. 16. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkki pobrane przed dializatorem, kontrola.	117
Tab. 17. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkki pobrane przed dializatorem, NIR.	117
Tab. 18. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkki pobrane za dializatorem, kontrola.	117

Tab. 19. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbki pobrane za dializatorem, NIR.....	117
Tab. 20. Podsumowanie wyników badań własnych dla pojedynczych dializ realizowanych przed i za dializatorem, dla prób kontrolnych oraz NIR.....	127
Tab. 21. Podsumowanie wyników badań własnych dla ogółu dializ realizowanych przed i za dializatorem. ....	128

## Wykaz najważniejszych skrótów i oznaczeń

<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	tlen singletowy
<b>16-DSA</b>	sonda nitroksylowa pochodna kwasu 16-doksylostearynowego
<b>AChE</b>	acetylocholinoesteraza
<b>ACT</b>	czas aktywowanego krzepnięcia ( <i>ang. Activated clotting time, activated coagulation time</i> )
<b>ADO</b>	automatyczna dializa otrzewnowa
<b>ADP</b>	adenozyno-5-difosforan ( <i>ang. Adenosine 5'-diphosphate</i> )
<b>ALP</b>	fosfataza zasadowa
<b>ALT</b>	aminotransferaza alaninowa
<b>ANS</b>	1-anilinonaftalenosulfonian
<b>AST</b>	aminotransferaza asparaginianowa
<b>ATP</b>	adenozyno-5-trifosforan, adenzynotrójfosforan ( <i>ang. Adenosine 5'- triphosphate</i> )
<b>AV</b>	tętniczo-żylna ( <i>ang. Arteriovenous</i> )
<b>AVF</b>	przetoka naturalna ( <i>ang. Arteriovenous fistula</i> )
<b>AVG</b>	przetoka syntetyczna ( <i>ang. Arteriovenous graft</i> )
<b>CADO</b>	ciągła ambulatoryjna dializa otrzewnowa
<b>Ca-i</b>	jonofor wapnia
<b>cAMP</b>	cykliczny adenzyno-3,5-monofosforan
<b>CCDO</b>	ciągła cykliczna dializa otrzewnowa
<b>CK</b>	kinaza kreatynowa
<b>CK-MB</b>	izoenzym sercowy kinazy kreatynowej
<b>CO</b>	tlenek węgla ( <i>ang. Carbon monoxide</i> )
<b>COX</b>	cyklooksygenaza ( <i>ang. Cyclooxygenase</i> )
<b>DNA</b>	kwas deoksyrybonukleinowy ( <i>ang. deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DO</b>	dializa otrzewnowa
<b>eNOS</b>	śródbłonkowa syntaza tlenku azotu ( <i>ang. Endothelial nitric oxide synthases</i> )
<b>EPR</b>	spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego ( <i>ang. Electron paramagnetic resonance</i> )
<b>ERA</b>	Europejskie Stowarzyszenie Nefrologiczne – Europejskie Towarzystwo
<b>EDTA</b>	Dializ i Transplantacji ( <i>ang. The European Renal Association –</i>

	<i>European Dialysis and Transplant Association)</i>
<b>ESRD</b>	krańcowa (schyłkowa) niewydolność nerek ( <i>ang. End-stage renal disease</i> )
<b>ETO</b>	tlenek etylenu ( <i>ang. Ethylene oxide</i> )
<b>fMLP</b>	receptor chemotaktyczny
<b>GFR</b>	współczynnik filtracji kłębuszkowej ( <i>ang. Glomerular filtration rate</i> )
<b>GGTP</b>	gamma-glutamylotranspeptydaza
<b>GMP</b>	guanozyno-5-monofosforan
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	nadtlenek wodoru
<b>Hb</b>	hemoglobina
<b>HCT</b>	hematokryt
<b>HD</b>	hemodializa
<b>HK</b>	wielkocząsteczkowy kininogen ( <i>ang. High molecular weight kininogen</i> )
<b>HOCl</b>	kwask podchlorawy
<b>IL-1</b>	interleukina 1
<b>iNOS</b>	indukowalna syntaza tlenku azotu ( <i>ang. Inducible nitric oxide synthases</i> )
<b>IR</b>	podczerwień ( <i>ang. Infrared</i> )
<b>K<sub>d</sub></b>	klirens dializatora
<b>K<sub>oA</sub></b>	współczynniki przepuszczalności masowej
<b>K<sub>KR</sub></b>	klirens kreatyniny
<b>K<sub>UF</sub></b>	współczynnik ultrafiltracji
<b>LDH</b>	dehydrogenaza mleczanowa
<b>LgCL</b>	chemiluminescencja zależna od lucygeniny
<b>LLLT</b>	terapia laserem niskiej mocy ( <i>ang. Low level laser therapy</i> )
<b>LmCL</b>	chemiluminescencja zależna od luminolu
<b>MAC</b>	kompleks atakujący błonę ( <i>ang. membrane attack complex</i> )
<b>MDA</b>	dialdehyd malonowy ( <i>ang. Malondialdehyde</i> )
<b>MDRD</b>	modification of diet in renal diseases
<b>MPO</b>	mieloperoksydaza
<b>NADPH</b>	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

	<i>(ang. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)</i>
<b>NIR</b>	bliska podczerwień <i>(ang. Near Infrared)</i>
<b>NO</b>	tlenek azotu <i>(ang. Nitric Oxide)</i>
<b>NOS</b>	syntaza tlenu azotu <i>(ang. Nitric oxide synthase)</i>
<b>ONN</b>	ostra niewydolność nerek
<b>OZ</b>	opsonizowany zymosan
<b>PA</b>	poliamid
<b>PAF</b>	czynnik aktywujący płytki krwi <i>(ang. platelet-activating factor)</i>
<b>PAH</b>	fitohemaglutynina <i>(ang. Phytohaemagglutinin)</i>
<b>PAN</b>	poliakrylonitryl
<b>PC</b>	poliwęglan
<b>PCHN</b>	przewlekła choroba nerek
<b>PCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy <i>(ang. Polymerase chain reaction)</i>
<b>PHA</b>	fitohemoaglutynina <i>(ang. Phytohemagglutinin)</i>
<b>PMMA</b>	poli (metakrylan metylu)
<b>PNN</b>	przewlekła niewydolność nerek
<b>PLT</b>	płytki krwi
<b>PP</b>	polipropylen
<b>PPP</b>	osocze ubogopłytkowe <i>(ang. platelet poor plasma)</i>
<b>PRP</b>	osocze bogatopłytkowe <i>(ang. platelet rich plasma)</i>
<b>PS</b>	polisulfon
<b>PU</b>	poliuretan
<b>RBC</b>	krwinka czerwona <i>(ang. Red Blood Cell)</i>
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>RNA</b>	Kwas rybonukleinowy RNA <i>(ang. ribonucleic acid)</i>
<b>RRT</b>	terapia nerkozastępcza, leczenie nerkozastępcze <i>(ang. Renal replacement therapy)</i>
<b>SKR</b>	stężenie kreatyniny w osoczu
<b>TEG</b>	tromboelastografia <i>(ang. Thrombelastography)</i>
<b>TF</b>	czynnik tkankowy <i>(ang. Tissue Factor)</i>
<b>TMP</b>	ciśnienie transmembranowe <i>(ang. Trans-membrane pressure)</i>
<b>TNF</b>	czynnik martwicy nowotworu <i>(ang. Tumor Necrosis Factor)</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	czynnik martwicy nowotworu typu $\alpha$ <i>(ang. Tumor Necrosis</i>

	<i>Factor α</i> )
<b>TRAP</b>	peptyd aktywujący receptor dla trombiny ( <i>ang. Thrombin-Receptor Activating Peptide</i> )
<b>TTL</b>	Test Transformacji Limfocytów
<b>TBARS</b>	<i>ang. Thiobarbituric acid reactive substances</i>
<b>UF</b>	ultrafiltracja
<b>UV</b>	promieniowanie ultrafioletowe ( <i>ang. Ultraviolet</i> )
<b>Ca-i</b>	jonofor wapnia
<b>WBC</b>	leukocyty ( <i>ang. White blood cells</i> )



## 1. Wprowadzenie

Przewlekła choroba nerek dotyka 7% ludzi w wieku powyżej 30 lat i odsetek ten rośnie do 25-35% w przypadku ludzi po przekroczeniu 65. roku życia. Charakteryzuje się silnie upośledzonym współczynnikiem filtracji kłębuszkowej, nadciśnieniem i aktywacją współczulnego układu nerwowego. Pacjenci cierpiący na tę chorobę są w grupie zwiększonego ryzyka rozwoju schyłkowej niewydolności nerek, a także zachorowalności i śmiertelności z powodu chorób sercowo-naczyniowych. W przewlekłej niewydolności nerek wyróżnia się pięć faz, dla których kryterium kwalifikacji jest współczynnik filtracji kłębuszkowej. Etap 1 to łagodnie upośledzona czynność nerek, z nielicznymi objawami. W etapie 2 i 3 pacjenci potrzebują medycznego spowolnienia i leczenia dysfunkcji nerek. Stadium 4 i 5 wymaga nieustannego leczenia, by zapewnić przeżycie chorego. Ostatni etap stanowi schyłkową niewydolność nerek, która wymaga zastosowanie terapii nerkozastępczej w postaci na przykład hemodializy z powodu spadku współczynnika filtracji kłębuszkowej do poziomu jedynie 10-15%. Dzięki hemodializie zostaje usunięty nadmiar płynów i produktów przemiany materii takich jak toksyny mocznicowe czy kreatynina. W porównaniu do prawidłowej funkcji nerek jej efektywność jest jednak dużo niższa, odznacza się oczyszczaniem z niskocząsteczkowych substancji w tempie 10-15 ml/min (dla nerek to 90-120 ml/min), a także gorszym w przypadku średnich i dużych cząsteczek, które z biegiem czasu się akumulują. Ponadto ze względu na liczne oddziaływania z elementami układu do hemodializy terapia ta nie jest wolna od efektów ubocznych. Zastosowane w układzie krążenia pozaustrojowego materiały nie są biokompatybilne, co powoduje aktywowanie leukocytów i płytek krwi prowadzące do zmian sercowo-naczyniowych i zwiększonego ryzyka chorób zakrzepowo-zatorowych mimo stosowania leków przeciwzakrzepowych w trakcie zabiegów [100].

Ze względu na powszechne stosowanie hemodializa jako terapii nerkozastępczej ciągle prowadzone są badania i rozwijane techniki mające na celu eliminację efektów ubocznych poprzez zastosowanie różnego rodzaju membran dializatora czy procedur antyzakrzepowych. Osiągnięcie akceptowalnych hemobiokompatybilnie błon dializatora musi iść w parze z zachowaniem odpowiedniej funkcjonalności polegającej na efektywnym usuwaniu szerokiego spektrum toksyn mocznicowych. Wybór głównego polimeru i kopolimeru opierający się na termodynamicznych zasadach tworzenia porowatych struktur podczas separacji faz, odczynniki stosowane w procesie formowania membran determinują uzyskanie struktur błonowych optymalnych dla transportu toksyn. Z drugiej strony otrzymanie materiału

o odpowiedniej hemokompatybilności wymaga zachowania równowagi pomiędzy właściwościami:

- powierzchnia silnie hydrofilowa powoduje zwiększoną aktywację dopełniacza i leukocytów/leukopenię;
- powierzchnia silnie hydrofobowa indukuje trombocytopenię i aktywację płytek;
- powierzchnia o ładunku silnie ujemnym jest niepożądana ze względu na aktywację szlaku zależnego od czynnika XII mogącego w skrajnych przypadkach wywołać szok anafilaktyczny, a ponadto sprzyja wiązaniu heparyny redukując jej aktywność antykoagulacyjną.

Ponadto poprawa stosowania hemodializ związana jest z coraz lepszymi technikami sterylizacji mających na celu zapobieganie zanieczyszczeniu bakteriami czy endotoksynami pochodzącymi z płynów dializacyjnych. Inne metody poprawy fizykochemicznych właściwości polimerów zwiększające ich biokompatybilność są zestawione w Tab. 1 [12].

Tab. 1. Strategie minimalizujące skutki hemoniekompatybilności w hemodializach [10].

		Koagulacja	Płytki	Dopełniacz	Leukocyty	Zapalenie
Pasywne	<b>Adsorpcja białek</b>	✓	✓	✓	✓	✓
	Hydrofilowość-hydrofobowość	✓	✓	✓		
	ładunek powierzchniowy	✓	✓			
	Chropowatość powierzchni	✓	✓			
Aktywne	<b>Biofunkcjonalizacja</b>					
	Immobilizowane (związane kowalencyjnie/pokryte i uwalniane)					
	Antykoagulanty (heparyna/heparynopodobne)	✓	✓			
	Czynniki wpływające na koagulację (inhibitory)	✓				
	Czynniki przeciwplatekcyjne	✓	✓			
	Antyoksydanty (np. witamina E)			✓		✓
	<b>Funkcjonalizacja chemiczna</b>					
Immobilizowane (pokryte lub związane kowalencyjne lub uwalniane)						
Przytwierdzenie grup funkcyjnych (np. iminy)					✓	
Zastąpienie grup funkcyjnych (np. grup -OH octanem/DEAE)	✓		✓	✓		

Zespół Prof. Komorowskiej od wielu lat zajmował się badaniem oddziaływania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) na struktury od najprostszych takich jak aminokwasy [86, 87], poprzez bardziej złożone jak białka czy DNA [120] do tych bardziej rozbudowanych jak błony [28, 61] czy komórki krwi [31, 58, 59, 60, 130, 133]. W tych oraz

innych badaniach wykazano, że na skutek działania promieniowania NIR erytrocyty wykazują zwiększenie odporności mechanicznej poprzez stabilizację błony komórkowej oraz na stres oksydacyjny; a także zaobserwowano zmianę potencjału powierzchniowego błony towarzyszącej zmniejszaniu się struktury rulonów [28, 58, 60, 62, 108]. Dzięki naświetlaniu leukocyty odznaczały się zmniejszoną produkcją reaktywnych form tlenu i aktywnością opsoninową, dochodziło do zmian przepuszczalności błony dla jonów wapniowych oraz stymulacji wydzielania czynników wzrostu, a także odnotowano efekt modulacyjny proliferacji limfocytów T [3, 32]. W przypadku płytek efekty działania promieniowania NIR zmanifestowane zostały w postaci redukcji spadku liczby płytek w czasie, wpływu na zdolności agregacyjne poprzez odwracalne hamowanie ich aktywacji oraz obserwowane zmiany w morfologii, zmniejszenie skłonności do tworzenia się agregatów i przylegania płytek [46, 114, 115, 117].

W mojej pracy została zaproponowana metoda wykorzystania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) do potencjalnej ochrony płytek krwi podczas prowadzenia hemodializy. W pierwszym etapie swoich badań zajęłam się procesem aktywacji płytek wskutek kontaktu z obcą powierzchnią i studiami nad mechanizmem, co zostało następnie wykorzystane w opracowaniu autorskiej metody badania stopnia aktywacji z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

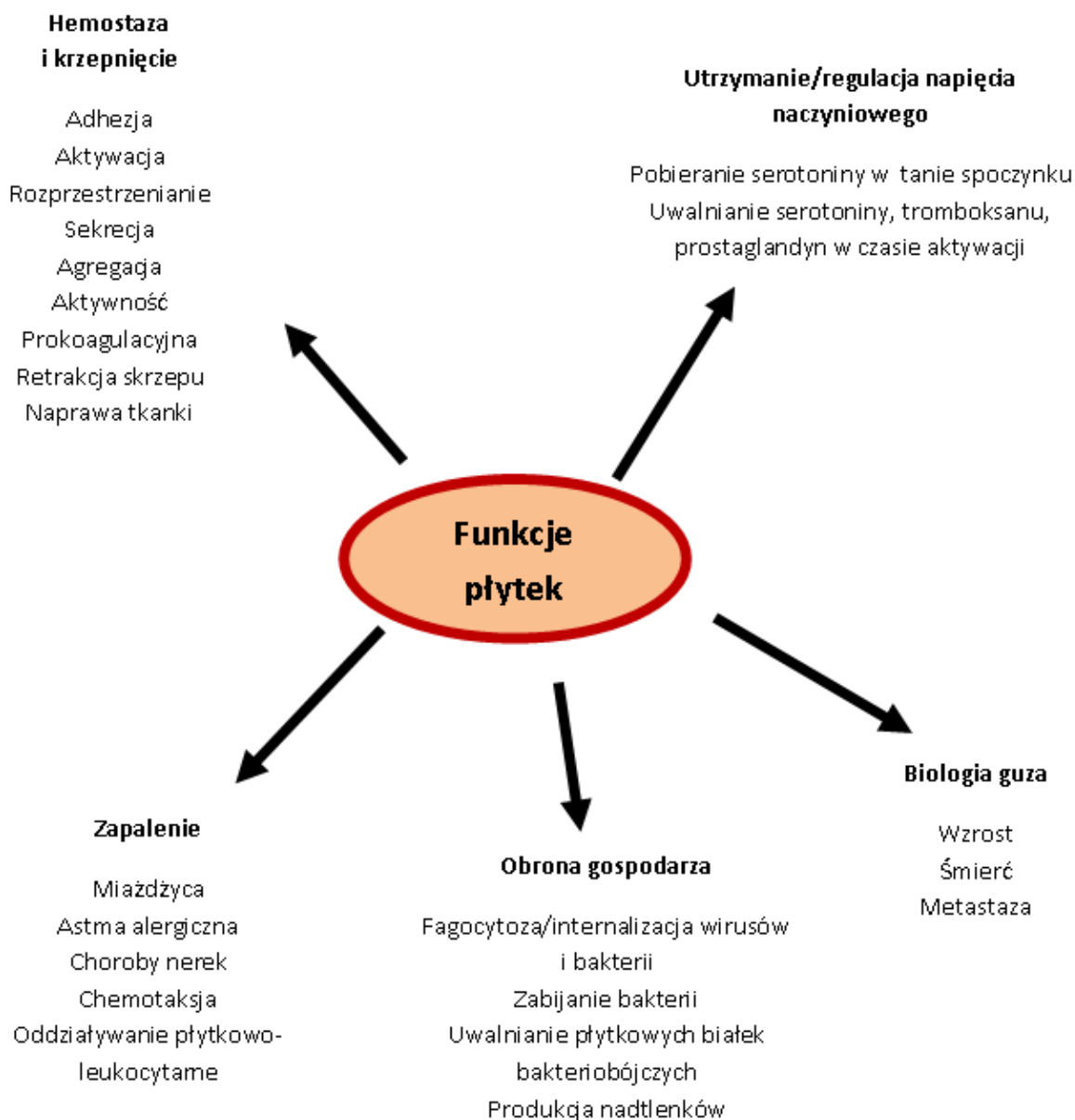
Moje badania w swej zasadniczej fazie stanowiły część szerszych badań *in vivo* dotyczących promieniowania NIR zastosowanego w trakcie hemodializy prowadzonej u owiec. Były one poprzedzone studiami pozwalającymi na określeniu czasu i częstotliwości przeprowadzania zabiegów w cyklu oraz jego długość w sposób najbardziej optymalny dla zwierzęcia i pozwalający na statystyczne opracowanie wyników. Przystąpienie do doświadczeń wymagało także doboru częstotliwości i miejsca pobierania próbek krwi w trakcie zabiegu w celu zbadania oddziaływania elementów urządzenia na komórki oraz oddziaływania czasu trwania procedury na komórki. Do realizacji swoich badań sprecyzowałam zakres wykonywanych oznaczeń, które miały pozwolić na ocenę istotnych własności płytek podczas hemodializy. Parametry płytek dializowanych owiec zostały zmierzone standardowymi metodami (agregometria impedancyjna) oraz opracowaną autorską metodą z zastosowaniem EPR.

## 2. Przegląd stanu wiedzy

### 2.1. Płytki krwi, ich funkcja i własności

Płytki krwi są najmniejszymi komórkami ludzkiej krwi posiadającymi kształt dysku o wymiarach około 2-4  $\mu\text{m}$  na 0,5  $\mu\text{m}$  i średniej objętości 7-11 fl. Są uwalniane z megakariocytów w szpiku kostnym w postaci pozbawionych jądra komórkowego fragmentów, które krążą we krwi w stężeniu  $150-450 \times 10^9/l$  [7]. Podczas dojrzewania megakariocytów dochodzi do duplikacji jądra bez podziału komórki, organele cytoplazmatyczne tworzą domeny stanowiące powstające płytki otoczone siecią tworzącą wgłębienie błony plazmatycznej. Lokalizacja megakariocytów w pobliżu ścian sinusoidalnych szpiku sprzyja uwalnianiu dużych fragmentów cytoplazmy do krążenia, w którym w wyniku sił ścinających dochodzi do ich fragmentacji do pojedynczych płytek. Produkcja megakariocytów jest kontrolowana głównie przez hormon trombopoetynę, ale oprócz niego regulowana jest przez liczne cytokiny i hormony takie jak interleukina 3,6 i 11. Średnia długość życia płytek krwi w krążeniu wynosi około 10 dni. Młodsze komórki wykazują się lepszą funkcjonalnością. Około jedna trzecia krążących płytek uwalniana jest ze śledziony. Większość płytek, które nie brały udziału w zachowaniu integralności naczyń usuwana jest z krążenia na skutek starzenia się komórek [44].

Dzięki swoim kształtom i rozmiarom w czasie krążenia płytki zlokalizowane są przy ścianach naczyń umożliwiając im odgrywanie kluczowej roli w procesach hemostazy i krzepnięcia. Ponadto mają swój udział we wrodzonym układzie odpornościowym, odpowiedzi zapalnej, inicjacji zmian miażdżycowych, skurczu naczyń krwionośnych, stymulują wzrost fibroblastów, komórek mięśni gładkich i naczyń [44]. Są też odpowiedzialne za proces inicjacji krzepnięcia, fibrynolizy i biorą udział rozwoju guzów [90]. W razie uszkodzenia tkanki funkcjonalna odpowiedź płytek obejmuje reakcje w postaci adhezji, rozprzestrzeniania się, reakcji wydzielniczych, agregacji, ekspozycji powierzchni prokoagulacyjnej, tworzenie mikrocząsteczek i retrakcji skrzepu, które mają za zadanie szybkie tworzenie czopu hemostatycznego zapobiegającego dalszemu wypływowi krwi. W osoczu rozpoczyna się seria reakcji chemicznych, w wyniku których fibrynogen zostaje przekształcony w cząsteczki fibryny, te zaś zlepiają się, tworząc siateczkę zasklepiającą ranę (Rys. 1) [7, 39].



Rys. 1. Płytki krwi i ich zróżnicowane funkcje w patofizjologicznych procesach [39].

Na skutek aktywacji płytki zmieniają kształt z dyskooidalnego w sferyczny z długimi dendrycznymi wypustkami ułatwiającymi adhezję. proces ten zachodzi dzięki znajdującej się w cytoplazmie aktynie i miozynie, które biorą też udział w retrakcji skrzepu [37]. Oprócz tych białek cytoplazma zawiera także dwa rodzaje ziarnistości wydzielniczych, które w stanie spoczynku komórki rozłożone są równomiernie. Ziarnistości gęste uwalniają ADP i wapń, które wzmacniają procesy agregacji i krzepnięcia na powierzchni. Drugim typem są ziarnistości alfa wydzielające rozległą grupę białek syntezowanych przez megakariocyty (czynnik von Willebranda, płytkowy czynnik 4), osoczowych pochodzących z endocytozy za pośrednictwem receptora (fibrynogen) czy pinocytozy w fazie płynnej (albumina, immunoglobulina G).

W trakcie aktywacji ziarnistości ulegają centralizacji w komórce i fuzji z błoną. procesy wydzielania i endocytozy są ułatwione dzięki pozostałościom po odgraniczeniu błony płytek powstających z macierzystych megakariocytów, które poprzez liczne wgłębienia tworzą sieć systemu kanalików połączonych powierzchniowo [*surface-connected or open canalicular system* (OCS)] [37, 44].

Tab. 2. Agoniści, ligandy, receptory istotne z punktu widzenia funkcjonowania płytek [44].

<b>Funkcja płytek</b>	<b>Agoniści, Ligandy</b>	<b>Receptory</b>	
Początkowa i następująca adhezja	vWF	GPIb/V/IX	
	TSP1	GPIb/V/IX, CD36	
	Kolagen	$\alpha 2\beta 1$ , GPVI, CD36	
	Fibrynogen	$\alpha \text{IIb}\beta 3$	
	Fibronektyna	$\alpha 5\beta 1$	
	Witronektyna	$\alpha \text{v}\beta 3$	
	Laminina	$\alpha 6\beta 1$	
	Duże siły ścinające	GPIb/V/IX	
	Aktywacja i wzmocnienie	Trombina	
		ADP	
TxA <sub>2</sub>		PAR1, PAR4, GPIb/V/IX	
Epinefryna		P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>12</sub>	
Serotonina		TP $\alpha$ , TP $\beta$	
MMP-2, MMP-1		$\alpha 2\text{A}$	
Kompleksy immunologiczne		5-HT <sub>2A</sub>	
Czynniki dopełniacza		Fc $\gamma$ IIa	
Plazmina			
Streptokinaza		Receptory C1q, C3a, C5a	
Agregacja/wzmocnienie i stabilizacja	fibryna	Aktywowany $\alpha \text{IIb}\beta 3$	
	vWF	Aktywowany $\alpha \text{IIb}\beta 3$ , GPIb/V/IX	
	TSP-1	Aktywowany $\alpha \text{IIb}\beta 3$ , CD36, IAP	
	Fibronektyna	Aktywowany $\alpha \text{IIb}\beta 3$	
	sCD40L	Aktywowany $\alpha \text{IIb}\beta 3$	
	Gas6	Axl	
	SDF-1, TARC, MDC	CXCR4, CCR4	

vWF - czynnik von Willebranda, TSP1 – trombospondyna 1, ADP – difosforan adenozyne, TxA<sub>2</sub> – tromboksan A<sub>2</sub>, MMP – metaloproteinaza macierzowa, IAP – białko związane z integryną, SDF-1 – stromal czynnik pochodzenia stromalnego, TARC – chemokiny regulowane aktywacją, MDC – chemokiny pochodzenia makrofagowego

Pierwszy krok w pierwotnej hemostazie, adhezja płytek do tkanki podśródbłonkowej (oddziaływanie pytki-ściana naczynia) i następująca agregacja (oddziaływanie płytki-płytki) zachodzi za pośrednictwem glikoproteinowych receptorów błonowych. Glikoproteina Ib-V-IX

jest aktywnym receptorem czynnika von Willebranda, który w wyniku ekspozycji z uszkodzonego naczynia powoduje natychmiastowe przyleganie płytek. Glikoproteina Ia-IIa tworzy aktywny receptor kolagenu zaangażowany w początkową adhezję płytek do macierzy podściółkowej. Najliczniej występującym białkiem powierzchniowym jest glikoproteina IIb-IIIa, która do przyłączenia przede wszystkim fibrynogenu wiążącego ze sobą płytki podczas agregacji wymaga zmian konformacyjnych wywołanych aktywacją płytek [37, 44].

Główni agoniści i cząsteczki adhezyjne/receptory z nimi oddziałujący przedstawione zostały w tabeli (Tab. 2). Wiązanie agonisty z receptorami, sieciowanie receptorów czy zmiany w błonie plazmatycznej wywołują złożoną kaskadę sygnałów z błony do cytoplazmy, powodujących aktywację płytek (*outside-in*), w następstwie której zachodzą procesy rearanżacji strukturalnych i sekrecji. W trakcie wtórnej hemostazy następuje wzmocnienie pobudzenia płytek do aktywności prokoagulacyjnej, produkcji trombiny i tworzenia stabilnej sieci płytkowo-fibrynowej [44].

## **2.2. Aktywacja i adhezja płytek do syntetycznej powierzchni**

### **2.2.1. Mechanizm adhezji**

Pierwszym zjawiskiem występującym wskutek kontaktu krwi z syntetyczną powierzchnią, w tym powierzchnią dializatora, jest adsorpcja białek na granicy faz. Proces adsorpcji białek jest złożonym problemem, którego badanie ma za zadanie wyjaśnić zależności między własnością powierzchni a ilością i specyfiką adsorpcji białek, selektywność adsorpcji z wieloskładnikowego płynu czy sposobów katalizy lub/i pośredniczenia lub/i zmieniania odpowiedzi biologicznej. Wciąż otwarte pozostają zagadnienia związane z nieodwracalnością adsorpcji, efektem Vromana, wielowarstwowością adsorpcji, energią adsorpcji czy przyjmowanymi modelami. Jedno ze sposobów rozumienia tego zjawiska zakłada adsorpcję jako proces gromadzenia białek w obszarze w pobliżu powierzchni zwanego interfazą oddzieloną od pozostałej masy roztworu, czyli z niego usuniętych wskutek kontaktu z tą powierzchnią zarówno poprzez silne i słabe oddziaływania. W podejściu tym unika się procedury przepłukiwania powierzchni w stosowanej metodzie badawczej, gdyż nie jest znane, która z zaadsorbowanej frakcji białek (słabo czy silnie związana) jest najistotniejsza w odpowiedzi biologicznej [129]. Adsorpcja jest opisywana jako oddzielanie cząstek chemicznych (białek) w interfazie od fazy głównej roztworu, co powoduje zwiększenie ich stężenia w interfazie w porównaniu z roztworem przy jednoczesnym usuwaniu stamtąd cząsteczek wody (ich ilość zależna od rozmiaru białka), natomiast ilość białka w interfazie jest proporcjonalna do jego stężenia w roztworze [110, 129].

W przyjętym modelu adsorpcji pojawienie się powierzchni hydrofobowej zaburza strukturę wody w jej bliskości, skutkując jej restrukturyzacją w kilku najbliższych warstwach interfazy z odpowiednią redystrybucją jonów. Adsorpcja indukuje znaczące przemieszczenie zarówno białek jak i wody odpowiednio do i z interfazy - ruch białek do interfazy indukuje przemieszczenie białek z najbliższego regionu, co z kolei indukuje dyfuzję do tego regionu z pozostałej części roztworu (dyfuzja białek wynikająca z gradientu stężeń wytworzonego przez reakcje hydratacyjne, interfaza rozrasta się do momentu braku różnic potencjałów chemicznych między interfazą a większością roztworu dla każdego rodzaju białka w roztworze). Zbliżające się białka tłoczą się w interfazie, są odpychane. Jednocześnie białka wypierają z interfazy wodę, a energia dehydratacji określa stopień zapełniania powierzchni i związany z nim preferowany stan adsorpcji (maksymalne stężenie i tym samym pojemność powierzchni jest zależna od energii dehydratacji interfazy i jest w przybliżeniu takie samo dla wszystkich białek w zależności od stężenia  $m/v$ , ale nie molowego). Interfaza wypełniana jest z obszaru o głębokości kilkudziesięciu nanometrów. Adsorpcja zostaje zakończona w ciągu milisekund w zależności od tempa organizacji zaadsorbowanych białek w zwartą warstwę(y), która po ustaleniu się równowagi adsorpcji ma grubość zależną od rozmiaru, upakowania i ilości warstw białka. Stężenie białek w stanie saturacji powierzchni jest większe w porównaniu ze stężeniem w roztworze i w porównaniu z granicą rozpuszczalności, (bez nakładania na siebie warstw hydratacyjnych białek) co modyfikuje ich własności chemiczne. Potencjał chemiczny (aktywność) zaadsorbowanego białka jest funkcją stężenia, ale niezaadsorbowanej masy na jednostkę powierzchni [129].

W przypadku krwi interfaza zostaje wypełniona białkami osocзовymi rywalizującymi w adsorpcji, co wydłuża ten proces. Nieustanna dyfuzja dwóch białek o różnych rozmiarach do interfazy powoduje niewielką selektywność pod względem rozmiaru wynikającą ze względnych szybkości dyfuzji. Samo wypełnianie interfazy jest szybkie, ale więcej czasu zajmuje organizacja warstwy do ostatecznego stanu. Najniższy stan energetyczny zostaje osiągnięty przy możliwie najcieńszej interfazie, ponieważ potrzebna jest praca do utworzenia objętości interfazy, dlatego wytwarza się siła kurcząca początkowo napuchniętą interfazę, która upakuje i uporządkuje warstwę(y) poprzez usunięcie wody z interfazy lub wody jak i początkowo zaadsorbowanych białek, co w przypadku roztworu zawierającego więcej niż dwa różne białka może powodować utworzenie bardzo cienkiej interfazy będącej silnie dyfuzyjnym obszarem. Przypuszcza się adsorpcja białek do powierzchni hydrofobowych jest procesem kontrolowanym przez wodę, a nie samo białko – większe cząsteczki usuwają większe objętości wody z interfazy, a różnice strukturalne nie wpływają silnie na energię adsorpcji



(energii oddziaływań z wodą). Białka o większej masie cząsteczkowej ujawniają większą pojemność powierzchni dla danego hydrofobowego adsorbentu i ustalonej powierzchni, a grubość interfejsu rośnie z rozmiarem białka [129].

Istnieje wiele czynników regulujących ten proces, które można podzielić na te związane ze składem roztworu (masa cząsteczkowa białek, ich stężenia, pochodzenie, ilość, siła jonowa) i własnościami powierzchni (topografia, hydrofilowość i właściwości chemiczne) [27, 70, 82, 93, 127, 129, 142, 149].

Przy dużych stężeniach białka następuje szybka adsorpcja; przy niecałkowitym pokryciu powierzchni możliwa jest denaturacja, a przy nasyceniu białka muszą wypierać inne, co wymaga energii i zmniejsza denaturację [29, 76, 93, 124, 129]. W przypadku białek różnego pochodzenia wynikające z tego różnice w glikozylacji mogą wpłynąć na różnice w adsorpcji, podobnie jak odłuszczenie albuminy. Ilość białek może skutkować pojawieniem się rywalizacji między nimi i dyfuzją zależną od rozmiarów [129].

Oddziaływania elektrostatyczne białek z powierzchnią są ekranowane przez dużą siłę jonową roztworu, o ile grupy funkcyjne nie wykazują silnych własności zasadowych/kwasowych [129, 137].

Większa porowatość absorbera powodująca zwiększenie jego powierzchni sprzyja wzmocnieniu adsorpcji. Ładunek powierzchniowy jest zależny od własności kwasowych/zasadowych. Zaobserwowano, że powierzchnie anionowe hydrofilowe posiadające słabo zasadowe grupy funkcyjne (hydroksylowe, karbonylowe, zjonizowane karboksylowe) hamują adsorpcję białek ze względu na silnie związaną w interfejsie wodę. Obecność grup funkcyjnych o własnościach kwasowo/zasadowych Lewisa lub ligandów specyficznie wiążących określone białka silnie zwiększa oddziaływania białek z powierzchnią. Dodatkowe grupy funkcyjne mogą posiadać własności wymiany jonów i za pomocą tego mechanizmu adsorbować białka (np. mika uwalnia potas do roztworu) [129].

Wzrost gęstości grup funkcyjnych zwiększa wiązanie wody z powierzchnią, co skutkuje spadkiem kąta kontaktu do  $0^\circ$  ze wzrostem zwilżalności; blisko kąta  $65^\circ$  powierzchnię przyjmuje się za ani hydrofilową, ani hydrofobową, gdzie niezaburzona znacząco struktura pobliskiej wody jest podobna do struktury i reaktywności pozostałej większości wody. Zaburzenie sieci wody przy powierzchni wpływa na odpowiedź biologiczną, na materii absorbera ze względu na własności rozpuszczalnika związane ze stopniem samousieciowania za pomocą wiązań wodorowych. Zmiany w wiązaniach wodorowych występujące wskutek kontaktu z powierzchnią modyfikują własności wody, co wpływa na rozmieszczenie jonów w obszarze kontaktowym, być może wpływając na pH w tym regionie [129].

Kontakt białek z powierzchnią powoduje zmniejszenie ich mobilności i zmienia czwartorzędową strukturę (denaturacja), co może przekładać się na zmiany własności biologicznych powierzchni, zwiększając lub zmniejszając aktywność w wywoływaniu odpowiedzi biologicznej. Występowanie denaturacji jest zależne od upakowania białek na powierzchni, co może wyjaśniać niższą jej pojemność od przewidywanej. Wszystkie białka to polimerowe łańcuchy zbudowane z nierównomiernie rozmieszczonych 20 aminokwasów, neutralnych lub naładowanych, z grupami hydrofilowymi lub hydrofobowymi, co daje wypadkową amfifilowość cząsteczek – pewne domeny i regiony są dobrze rozpuszczalne, a te mniej dążą do ich usuwania z roztworu i takie zachowanie jest odpowiedzialne za adsorpcję białek z roztworu do powierzchni. Istotną rolę w procesie adsorpcji odgrywa faza wodna, której samoasocjacja z udziałem wiązań wodorowych w temperaturze pokojowej na poziomie 75% wszystkich cząsteczek połączonych z 3-4 sąsiadami powoduje, że molekuly wprowadzane do wody oddziałują na sieć wodorową i są usuwane z roztworu w celu odtworzenia wiązań wodorowych między cząsteczkami wody rozdzielonymi przez te białka (efekt hydrofobowy). Dodatkowo woda jest bezpośrednio związana z powierzchnią w zależności od własności absorbera. Dlatego usunięcie wody przez adsorbujące białko jest kosztowne energetycznie, a jej ilość zależy od masy cząsteczkowej białka czy ilości warstw adsorbujących. Energia oddziaływania białek z powierzchnią nie przewyższa znacznie energii termicznej, o ile nie pojawia się silne pole elektryczne jak w przypadku powierzchni zdolnych do wymiany jonów lub w czystej wodzie z powodu braku siły jonowej ekranującej powierzchniowy ładunek. Wykazano spadek adsorpcji ze wzrostem hydrofilowości powierzchni, co wynika z tego, że siły kwasowo-zasadowe (w tym polarność) stają się za małe w porównaniu z energią potrzebną do dehydratacji powierzchni (wzrost kosztu energetycznego związanego z dehydratacją), będąc dodatkowo ekranowane w roztworze o dużej sile jonowej. Oddziaływanie białek z powierzchnią w pewnym stopniu jest oparte na oddziaływaniach niezależnych od hydrofilowości, co potwierdza większa adsorpcja na powierzchni hydrofobowej, z której, przy braku grup funkcyjnych mogących wiązać białka, potrzebne jest tylko usunięcie względnie słabo związanej powierzchniowo wody i gdzie nie jest obecna podwójna elektryczna warstwa blokująca przybliżanie białek do powierzchni [129].

Jednym z czynników wpływających na proces adsorpcji białek jest ich stężenie w odniesieniu do poziomu fizjologicznego. Obserwowana zależność adsorpcji od rozcieńczenia w stosunku do fizjologicznego roztworu jest tłumaczona słabą aktywacją powierzchnią niektórych białek w stężeniu fizjologicznym [129].

Odpowiedź biologiczna na materiał występuje w postaci np. koagulacji osocza, aktywacji czynnika XII, adhezji komórek, adsorpcji białek. Okazuje się, że adhezji komórek ssaków nie sprzyjają powierzchnie hydrofobowe o dużej pojemności natomiast sprzyjają hydrofilowe adsorbujące mało lub wcale białek. Aktywacja koagulacji osocza jest mała na powierzchniach hydrofobowych adsorbujących białka i wysoka na hydrofilowych odpornych na adsorpcję. Powierzchnie hydrofilowe aktywują, ale nie adsorbują czynnika XII. Czynniki te mogą zostać aktywowane także na powierzchniach hydrofobowych, na których rywalizuje z innymi białkami osocza, obniżając koagulację osocza wywołaną kontaktem ze sztucznym materiałem. Wynika z tego, że nie wszystkie odpowiedzi biologiczne są katalizowane, pośredniczone czy modulowane przez adsorbowane białka, a niektóre nawet poprzez ich brak [129].

Wskutek kontaktu sztucznej powierzchni z krwią w ciągu kilku sekund zostaje ona pokryta warstwą białek osocza o konfiguracji zależnej od własności powierzchni, który stanowi nową powierzchnię adhezji płytek. Spośród wszystkich białek osocza szczególną rolę w procesie adhezji płytek odgrywa fibrynogen.

Fibrynogen to białko z klasy glikoprotein, dimer, które tworzą 3 pary łańcuchów: łańcuch  $A\alpha$  zbudowany z 610 aminokwasów, łańcuch  $B\beta$  złożony z 461 aminokwasów i heterogeniczny  $\gamma$  łańcuch najczęściej utworzony przez 411 aminokwasów, rzadziej 427 aminokwasów. Strukturę białka stabilizuje 29 wewnątrz- i międzyłańcuchowych mostków siarczkowych. Łańcuch  $A\alpha$  w pierwszej części przybiera strukturę drugorzędową w postaci  $\alpha$  helisy. Dalszą część tego łańcucha charakteryzują reszty polarne i niepolarne niejednorodnie rozmieszczone: w regionie aminokwasów 201-400 znajduje się mało reszt niepolarnych, natomiast dużo seryny, glicyny, treoniny i proliny, co ułatwia tworzenie zwartej struktury. Wykazano obecność tryptofanu o charakterze cyklicznym powtarzającym się co 13 reszt aminokwasowych 9-10 razy. Region 200 reszt aminokwasowych z końca C jest także bogaty w te aminokwasy i dodatkowo znajduje się tam dużo niepolarnych łańcuchów bocznych, a jego koniec zawiera klastery reszt o wysokim pK, dlatego jest on dodatnio naładowany. Pierwsze 75 reszt łańcucha  $B\beta$  w domenie E stanowi duża ilość proliny i alaniny, w następnych 122 znajdują się 2 wiązania siarczkowe, natomiast ostatnie 264 reszt tworzy domeny D, gdzie znajduje się 11 tryptofanów. Najliczniejszym aminokwasem w łańcuchu  $B\beta$  jest glicyna. Fibrynogen posiada dwa motywy RGD w łańcuchu  $A\alpha$ :  $A\alpha$  95-98 (RGDF) i  $A\alpha$  572-575 (RGDS) oraz sekwencję dodekapeptydu His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (HHLGGAKQAGDV) w łańcuchu  $\gamma$  (C-koniec  $\gamma$  400-411). Główne miejsce oddziaływania fibrynogenu z receptorem płytkowym odbywa się za pomocą sekwencji dodekapeptydu  $\gamma$  400-411, natomiast duże, mniej reaktywne jest miejsce RGDS w łańcuchu  $\alpha$ . Wspomniany segment

łańcucha  $\gamma$  bierze też udział w sieciowaniu miejsc donora i akceptora reakcji katalizy czynnika XIIIa i zaangażowany jest w agregacyjną funkcję fibrynogenu. Jego reaktywność z receptorem w dużym stopniu jest zależna od dwóch reszt histydyny odpowiadających głównie za biologiczną aktywność, których usunięcie silnie ją obniża. Oddziaływanie z receptorem opiera się także na innych resztach jak lizyna<sup>406</sup> i walina<sup>411</sup>. Część łańcucha  $\gamma$  jest silnie hydrofilowa eksponowana do rozpuszczalnika i łatwo dostępna dla enzymów i znajduje się przypuszczalnie w sąsiedztwie hydrofobowego segmentu tworzącego rozciągniętą ciągłą strukturę  $\beta$  przy niezdefiniowanej strukturze części hydrofilowej. Być może mostek siarczkowy obecny między lizyną<sup>406</sup> i walina<sup>411</sup> lub kwasem asparaginowym<sup>410</sup> stabilizuje tworzone wiązanie. Fibrynogen ma zdolność wiązania się także do adhezyjnych glikoprotein – fibronektyny, trombospondyny, vWf, oddziaływania z monomerami fibryny czy reagowania z kolagenem [1, 56, 76, 127, 149].

Adsorpcja fibrynogenu często prowadzi do konformacyjnych i/lub orientacyjnych zmian – względnie niestabilna struktura białek ma tendencję do rozwijania, co pozwala na tworzenie dodatkowych miejsc styczności wewnętrznych obszarów z powierzchnią i czemu często towarzyszy utrata drugorzędowej lub trzeciorzędowej struktury. Wiele badań wykazywało indukowane energią adsorpcji zmiany konformacji, których wzory śledzono za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Nie wyklucza się, że adsorpcja fibrynogenu może spowodować udostępnienie nowych miejsc wiążących z receptorem GPIIb/IIIa innych niż RGD w łańcuchu  $\alpha$  i dodekapeptyd końca C łańcucha  $\gamma$ , podobnie jak poprzez wiązanie z tym receptorem. Być może także zmiany konformacji wskutek adsorpcji, wiązania z receptorem GPIIb/IIIa i tworzenia skrzepu mogą być podobne [24, 29, 76, 142].

Fibrynogen jest białkiem amfifilowym z hydrofilowym regionem w karboksylowym końcu łańcucha  $\alpha$ , gdzie znajduje się ładunek dodatni. W środowisku polarnym zarówno białka jak i powierzchnie posiadają ładunek powierzchniowy wpływający na rozkład jonów i oddziaływania między zawartymi w nim cząsteczkami. To tłumaczy adsorpcję na powierzchniach o odmiennych własnościach. Skład chemiczny i fizykochemiczne własności powierzchni mogą znacznie wpływać na tempo, zakres i mechanizm adsorpcji, czyli konformacje białek i siłę oddziaływania zależną od orientacji białka, przy czym zwilżalność jest uznawana za istotną dla ilości i stopnia zmian konformacyjnych. Zbliżające się do powierzchni białka muszą doprowadzić do usunięcia wody z powierzchni do roztworu i jednocześnie tracą swobodę konformacyjną. Powszechnie uważa się, że oddziaływania hydrofobowe stanowią energetycznie dominującą siłę między białkami i powierzchniami, co implikuje wzrost adhezji ze spadkiem zwilżalności. Wzrost powinowactwa fibrynogenu do

powierzchni wiąże się ze wzrostem energii potrzebnej do wyparcia wody z powierzchni przez adsorbujące białka. Zaburzenie struktury wody w pobliżu hydrofobowych powierzchni może być zmieniane częściowo przez skład rozpuszczalnika, w którym się znajduje. Adsorbujący fibrynogen zarówno na hydrofobowym graficie i hydrofilowej micy wykazuje trójglobularną postać, przy czym zarejestrowane lokalizacje domen D i E mogą się różnić i świadczyć o sile oddziaływania z powierzchnią czy dokonującym się rozwijaniu struktury, nie wykluczając różnych orientacji grup funkcyjnych. Początkowe tempo adsorpcji do hydrofilowych i hydrofobowych powierzchni jest ograniczone przez współczynnik transportu, natomiast końcowe pokrycie zależy od zakresu relaksacji międzyfazowej. Adsorpcja na hydrofilowej i ujemnie naładowanej powierzchni miki zachodzi za pośrednictwem karboksylowych końców łańcucha  $\alpha$  przypuszczalnie zwiniętych pod cząsteczką fibrynogenu między powierzchnią a domenami D i E, dając zwarty wygląd, co nie wyklucza konformacji aktywnej. Na hydrofilowym podłożu początkowe oddziaływanie poprzez C-końce łańcuchów  $\alpha$  nie wywołują większych zmian struktur drugorzędowych w czasie, dopiero poadsorpcyjna zmiana orientacji jedynie w obszarze kontaktowym w kierunku większego i tym samym silniejszego oddziaływania z powierzchnią prowadząca do większego jej pokrywania może powodować zmiany w wiąźaniach wodorowych. Na takiej powierzchni fibrynogen wykazuje małą dostępność łańcucha  $\alpha$  i dużą łańcucha  $\gamma$  z odpowiednimi miejscami wiążącymi przeciwciała i znaczeniu funkcjonalnym dla adhezji płytek. Konformacja fibrynogenu w roztworze najbardziej przypomina tę reprezentowaną po adsorpcji na micy, gdzie oddziaływania są względnie słabe i powodujące najmniejsze zaburzenia, a struktura jest elastyczna i ze swobodą ruchu. Podłoże hydrofilowe posiadające dodatni ładunek zwiększa stopień indukowanych modyfikacji strukturalnych w porównaniu z ładunkiem ujemnym. Na podłożu hydrofobowym przyjmuje się, że adsorpcja jest od początku silna, szybko dochodzi do znaczącej denaturacji lub rozwijania i towarzyszą temu tylko niewielkie zmiany konformacji w czasie. Rozwijanie to związane jest z rozerwaniem wewnętrznych hydrofobowych wiązań i reorientacją domen w celu zapewnienia większych niespecyficznych oddziaływań hydrofobowych z powierzchnią i zredukowania dostępu rozpuszczalnika do powierzchni, czyli innymi słowy w celu zminimalizowania międzyfazowej energii i zmaksymalizowania wiązań między białkiem i powierzchnią. Im bardziej hydrofobowa powierzchnia, tym większe zmiany konformacji w postaci utraty  $\alpha$ -helis i wzrostu struktur  $\beta$  (natywny fibrynogen ma więcej  $\alpha$ -helis niż  $\beta$ -kardek) objawiające się rozwijaniem (denaturacją), co zaobserwowano także dla albuminy. Najmniejsza zwilżalność powoduje największe zmiany stanu z uwzględnieniem dostępności domeny D (związane z największą siłą oddziaływania z powierzchnią), a stopień deformacji

zmniejsza się ze wzrostem hydrofilowości. Na podłożu hydrofobowym jak na przykład na kopolimerze poliuretanu w cząsteczce fibrynogenu dostępne są oba łańcuchy z miejscami wiążącymi, choć mniej  $\gamma$  niż  $\alpha$  [1, 4, 24, 27, 29, 43, 76, 103, 110, 112, 113, 126, 127, 142, 149]. Obecność ładunku na powierzchni także ma wpływ na strukturę białek. Ujemnie naładowany materiał otoczony odpychającą warstwą dyfuzyjną tego ładunku powoduje mniejsze indukowane zmiany konformacyjne w postaci utraty helis, skutkujące niedostępnością części hydrofobowego rdzenia co przekłada się na mniejszą adhezję płytek. Podobnie ładunek dodatni generuje słabsze modyfikacje struktury, przy czym zakłada się różnice w orientacji i konformacji adsorbowanych białek: na dodatnio naładowanej powierzchni adsorpcja boczna z silnie ujemnymi regionami ku powierzchni i dodatnimi regionami skierowanymi w stronę roztworu nie implikuje silnych zmian konformacji i tym samym wzmożonej adhezji płytek. Wpływ obecności ładunku na adsorpcję fibrynogenu nabiera znaczenia także w przypadku silnie uwodnionego i ujemnie naładowanego glikokaliksu komórkowego powodującego odpychanie fibrynogenu i tym samym ograniczając oddziaływanie do specyficznych z receptorem GPIIb/IIIa [24, 43, 110].

Struktura cząsteczki fibrynogenu, w tym istnienie mostków siarczkowych między łańcuchami  $\alpha$  a domeną E, jest zależna od pH środowiska czy obecności jonów. Odczyn środowiska modyfikuje ładunek białka oraz jego konformację. Oddziaływanie białek z powierzchnią stanowi wypadkową sił elektrostatycznych i van der Waalsa. Dla każdego białka można określić punkt izoelektryczny, w którym wypadkowy ładunek jest zerowy, a więc oddziaływanie elektrostatyczne między cząsteczkami jest minimalne. Kluczowe pozostają wiązania wodorowe i siły van der Waalsa prowadzące do tworzenia mocno upakowanych monowarstw i wzrostu adsorpcji. W przypadku fibrynogenu punkt izoelektryczny znajduje się w pH = 5,8, gdzie obserwuje się najsilniejszą adsorpcję na przykład na krzemie. W takim pH oddziaływanie ujemnej hydrofilowej miki z fibrynogenem odbywa się być może za pośrednictwem dodatnio naładowanych reszt lub ekspozycji obszarów hydrofobowych z wnętrza białka w trakcie adsorpcji na mice [24, 126, 138].

W pH mniejszym od punktu izoelektrycznego wypadkowy ładunek fibrynogenu jest dodatni i wzrasta ze spadkiem pH i spadkiem siły jonowej. W takim środowisku siły hydratacyjne tracą na znaczeniu. Dla pH równego 3,5 fibrynogen wykazuje najsłabszą adsorpcję i tworzenie agregatów. Białko przybiera konformację, w której domeny karboksylowych końców łańcucha  $\alpha$  są odczepione odwracalnie od centralnej domeny E i zorientowane prostopadle do domen D w wyniku odpychania elektrostatycznego (wypadkowy ładunek dodatni), co może inicjować agregację lub potęgować oddziaływanie

z ujemnie naładowanymi powierzchniami. Taka struktura wiąże się także ze wzrostem lepkości dynamicznej fibrynogenu. W tych warunkach powierzchnia miki jest obojętna, zatem nie pojawiają się oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe, a adsorpcja jest regulowana transportem masowym; przypuszczalnie następuje rekonformacja i pojawienie się naładowanych lub niepolarnych grup na powierzchni białka. Część badaczy zakłada adsorbowanie fibrynogenu w niskim pH w orientacji pionowej uznawanej za odwracalną [1, 52, 125, 126, 137, 138].

W roztworze o pH powyżej punktu izoelektrycznego, a więc także fizjologicznym (pH =7,4) fibrynogen jest wypadkowo ujemnie naładowany, przybiera półzwartą konformację z karboksylowymi końcami łańcucha  $\alpha$  przytwierdzonymi do centralnej domeny E o kącie  $56^\circ$  między ramionami a osią cząsteczki. Ze względu na silnie niejednorodnie rozłożony ładunek (dodatni na końcach ramion bocznych, ujemny w części rdzeniowej) i jego rozdzielenie w odległości 20 nm pojawia się moment dipolowy, który tłumaczy adsorpcję fibrynogenu na ujemnych powierzchniach (mika, szkło, stal, polistyren) – obok oddziaływań typu van der Waalsa przyciągające oddziaływanie elektrostatyczne między powierzchnią i naładowanymi dodatnio końcami C łańcuchów  $\alpha$  lokującymi się pod "lewitującą" resztą cząsteczki podczas adsorpcji. Niektórzy przypuszczają, że tego typu oddziaływania prowadzą do powstania nieodwracalnie zaadsorbowanego białka w orientacji bocznej. Ze wzrostem pH następuje spadek gęstości ładunku elektrokinetycznego powierzchni miki i adsorpcja kationów w tym  $H^+$  [1, 12, 52, 110, 137].

Obserwowano występowanie agregacji fibrynogenu dla pH między 4,5 a 7,5 i jej zanikanie dla  $7 < \text{pH} < 5$ . pH powyżej 9 indukuje konfigurację fibrynogenu wydłużoną z łańcuchami  $\alpha$  odcepionymi od domeny E. W środowisku o pH do 9,7 fibrynogen zachowuje stabilność adsorpcji, ale powyżej 11 dochodzi do zaniku adsorpcji na powierzchniach o ładunku ujemnym. Wynika to z faktu, że w dodatnio naładowanych ramionach znajdują się głównie grupy amidynowe argininy i lizyny o pK 10,5 i 9,7 [1, 12, 137, 138].

Skład rozpuszczalnika może wpływać na adsorpcję białek poprzez oddziaływanie elektrostatyczne (wpływ na podwójną warstwę dyfuzji poprzez zmianę wypadkowego ładunku substratu i białka zależnych od punktów izoelektrycznych oraz indukowanie koadsorpcji małych jonów). Cząsteczki posiadające ładunek są otoczone warstwą dyfuzyjną, której grubość zależy od siły jonowej środowiska. Wraz z obniżaniem siły jonowej zwiększa się wypadkowy ładunek fibrynogenu, co prowadzi do reorganizacji strukturalnej ramion bocznych, na których obecność ładunku wymusza przybieranie przez białko postaci rozciągniętej i jego lepkość dynamiczna się zwiększa. Przy niskim stężeniu soli oddziaływanie białka z powierzchnią

kontrolowane jest przez równowagę między odpychaniem elektrostatycznym pochodzącym ze spadku entropii podczas nakładania się podwójnych warstw i przyciągającymi siłami van der Waalsa. Wzrost siły jonowej powoduje zmniejszenie grubości elektrycznej podwójnej warstwy wokół naładowanej powierzchni lub cząsteczki (mniejszy ładunek wypadkowy), co skutkuje ekranowaniem odpychania elektrostatycznego i przeważaniem sił przyciągających van der Waalsa. Tym samym cząsteczki fibrynogenu mogą być bliżej powierzchni, zapewniając ich silniejszą adsorpcję. W takich warunkach fibrynogen przybiera bardziej zwartą konformację z ramionami skierowanymi do centralnej domeny. Większa siła jonowa przyczynia się także do redukcji poprzecznego odpychania między zaadsorbowanymi białkami, co daje większą ich gęstość na powierzchni. Przy dalszym wzroście siły jonowej powyżej poziomu fizjologicznego osocza zaobserwowano spadek adsorpcji fibrynogenu, co tłumaczono dominacją ekranowania międzycząsteczkowych sił odpychających prowadzącą do agregacji i spadku efektywnego stężenia białka w roztworze czy siłami hydratacyjnymi ekranującymi siły przyciągające i przybieraniem przez białko jeszcze bardziej zwartej struktury zapobiegającej jego przytwierdzeniu do powierzchni. Dodatkowo obecne w roztworze wielowartościowe jony mogą wiązać się z naładowanymi obszarami białka, neutralizować gęstość ładunku i zwiększać jego hydrofobowość, co przekłada się na wzrost adsorpcji [1, 24, 103, 125, 126, 137, 138].

Badania wykazały, że adsorpcja fibrynogenu zmienia się przy różnych rozcieńczeniach osocza, czyli stężeniach zawartych w nim białek i jest to częściowo związane z efektem Vromana. Stężenie fibrynogenu stosowanego do pokrycia powierzchni ma znaczenie dla wiązania do odpowiednich jego fragmentów przeciwciał, co sugeruje, że gęstość wpływa na konformację białka. Przy małej gęstości białek (dużym rozcieńczeniu osocza lub w buforze) adsorbujący się fibrynogen posiada konformację inną niż natywna, prawdopodobnie z eksponowanym wskutek adsorpcji regionie łańcucha  $\gamma$  w N-końcu 1-78 i fragmencie D (95-265), zbliżoną do przybieranej po denaturacji (rozwijaniu) poprzez immobilizację i podobną do wywołanej mocznikiem. Także ukryty w natywnej postaci region  $A\alpha$  241-476 i 240-268 staje się bardziej dostępny przy małej gęstości białek. Przy małym upakowaniu fibrynogen ma więcej czasu na rozwijanie zanim następna cząsteczka zaadsorbuje się w pobliżu, dlatego pokrywa większą przestrzeń i posiada więcej miejsc kontaktu z powierzchnią wynikającą z silniejszego odkształcenia denaturacyjnego i ułożeniem horyzontalnym cząsteczek pokrywających powierzchnię. Następuje silniejsza utrata  $\alpha$ -helis na rzecz struktur  $\beta$ . Wraz ze wzrostem stężenia osocza zmniejsza się powinowactwo fibrynogenu do powierzchni wynikające z silniejszej rywalizacji ze względu na obecność innych białek, przy czym rośnie szybkość adsorpcji. Przy dużej gęstości adsorbowany fibrynogen przyjmuje konformację



zbliżoną do białka w roztworze. Duże stężenie fibrynogenu powoduje wieloetapową adsorpcję (inaczej niż w przypadku albuminy) – reorientacja długiej osi prostopadle do powierzchni być może jest napędzana wzrostem oddziaływań hydrofobowych między adsorbowanymi cząsteczkami [29, 76, 93, 112, 113, 122, 124].

W złożonym środowisku składającym się z wielu białek może pojawić się konkurencyjna adsorpcja z wolno adsorbowanymi włóknistymi białkami takimi jak fibrynogen, które zastępują szybko adsorbujące białka takie jak albumina (efekt Vromana). Skład i konfiguracja utworzonej warstwy adsorbowanych białek osocza jest zależna od natury powierzchni, jednak obserwuje się adsorpcję bardziej fibrynogenu niż innych białek, co koreluje z jego zdolnością przyspieszania adhezji płytek. W następnym etapie może dojść do desorpcji poprzez oddziaływanie z innymi składnikami osocza i zastąpienie wysokocząsteczkowym kininogenem (efekt Vromana). Konformacja fibrynogenu immobilizowanego w obecności albuminy lub osocza wydaje się być bardziej natywna niż dla samego buforu [70, 76, 149].

Dodatkowo wcześniejsza preadsorpcja albuminy na powierzchni szczególnie hydrofobowej może spowodować tak zwaną pasywację, utrudniającą zastępowanie jej przez fibrynogen, a efekt jest tym silniejszy, im dłużej albumina była zaadsorbowana [43, 142].

Niespecyficzne oddziaływania hydrofobowe stanowią główną siłę decydującą o adsorpcji (szybkie) i następującym skutkiem minimalizacji energii rozciąganiu (wolniejsze), które skutkuje także mniejszą grubością warstwy zaadsorbowanej białka po godzinie od początku adsorpcji [110].

### **2.2.2. Adhezja płytek do sztucznych powierzchni**

Mechanizm adhezji płytek do śródbłonka jest dość dobrze poznany i główną rolę odgrywają w nim specyficzne oddziaływania między błonowymi glikoproteinami i ligandami na powierzchni śródbłonka. Przy dużych siłach ścinających początkowa adhezja komórek następuje poprzez połączenie glikoproteiny GPIb do czynnika von Willebranda (*von Willebrand factor*, vWF) przyłączonego wcześniej do śródbłonkowego kolagenu. We wtórnej fazie ważniejsze okazują się receptory glikoproteinowe GPIIb/IIIa i GPIa/IIa, które mają za zadanie przytwierdzenie do utworzonej monowarstwy kolejnych płytek za pomocą fibrynogenu [106]. Jednakże adhezja mająca miejsce na sztucznej powierzchni to proces nie całkiem zrozumiany i jego molekularne podstawy nie są dobrze określone [74, 106]. Pokazano, że w następstwie adhezji płytek aktywowanej poprzez specyficzne receptory i towarzyszącemu rozprzestrzenianiu uwalniane są ziarnistości i tworzone mikropęcherzyki, których ilość jest zależna od rodzaju materiału [82]. Głównym białkiem pośredniczącym w adhezji płytek na

syntetycznym materiale jest fibrynogen, o czym przekonuje brak komórek na powierzchni np. szkła w środowisku osocza afibrynogenemicznego [19, 27, 36, 70, 74, 96, 106, 124, 127, 143, 149, 155]. To założenie potwierdza fakt, że najliczniejszym i aktywnie oddziałującym receptorem płytkowym jest receptor GPIIb/IIIa właśnie dla fibrynogenu [97]. Receptor ten należy do rodziny integrzyn i złożony jest z dwóch niekowalencyjnie związanych podjednostek ( $\alpha$  i  $\beta$ ), które do utrzymania struktury heterodimerskiej potrzebują dwuwartościowych jonów wapnia czy magnezu, które prawdopodobnie mają swe miejsca wiążące w łańcuchach  $\alpha$ . Obok fibrynogenu receptor ten może w zależności od sekwencji RGD (Arg-Gly-Asp) sposób wiązać witronektynę, fibronektynę i czynnik von Willebranda i niezależnie od tej sekwencji wiązać fibrynogen w miejscu zlokalizowanym w C-końcu łańcucha  $\gamma$  [19, 53]. Innymi niespecyficznymi receptorami integrzynowymi biorącymi udział w adhezji są GP Ic/IIa ( $\alpha 5\beta 1$ ) i GP ( $\alpha 5\beta 3$ ) dla fibronektyny, witronektyny i lamininy [97]. Na powierzchni poza tymi białkami następuje także adsorpcja albuminy,  $\gamma$ -globulin, lipoprotein, trombospondyny, czynnika XII, wysokocząsteczkowego kininogenu, prekalikreiny czy plazminogenu, które są w dynamicznej równowadze z tymi zawartymi w osoczu. Fibrynogen i  $\gamma$ -globuliny wzmagają adhezję płytek i leukocytów, a ponadto aktywacja układu dopełniacza wpływa na odkładanie się i aktywację płytek [74].

Płytki w stanie spoczynku nie wiążą się z natywnym fibrynogenem (wymagana jest ich aktywacja do wiązania rozpuszczalnego fibrynogenu), jednak jego immobilizacja może powodować adhezję płytek, co jest skutkiem potencjalnych zmian konformacyjnych indukowanych procesem immobilizacji, zmian własności chemicznych i biologicznych danej powierzchni i zwiększonym prawdopodobieństwem nawet słabych oddziaływań dających stabilną adhezję płytek bez dodatkowego pobudzenia. Istnieje hipoteza, że w roztworze fibrynogen występuje jako jednowartościowy ligand o małym powinowactwie do receptora, które zwiększa się wskutek adsorpcji i przekształceniu w wielowartościowy. Oddziaływanie zaadsorbowanego fibrynogenu z maskowanym i o małym powinowactwie receptorem prowadzi do lokalnego wzrostu poziomu wapnia, co uruchamia aktywację błonowych fosfolipaz, produkcję wtórnych przekaźników, generalny wzrost wapnia cytoplazmatycznego, powodując aktywację kinazy lekkiego łańcucha miozyny, ekspozycję kolejnych receptorów fibrynogenu już o wyższym powinowactwie, co jest wzmacniane poprzez sekrecję ADP i aktywację fosfolipazy A2 prowadzącej do produkcji tromboksanu A<sub>2</sub>. Być może odpowiedź płytek na kontakt z powierzchnią uruchamiana zostaje innymi szlakami niż przez agonistów [27, 70, 74, 76, 99, 106, 129, 149].

Badania wykazały, że adhezja płytek nie jest skorelowana z ilością adsorbowanego fibrynogenu, lecz jest zależna od zmian strukturalnych białka wywołanych adsorpcją na powierzchni, eksponowaniem części rdzenia hydrofobowego i dostępności miejsc wiążących płytki, a tym samym umożliwieniem receptorom błonowym w nieaktywnym stanie związania fibrynogenu. Nie wyklucza się jednak, że indukowane adsorpcją rozwijanie fibrynogenu poza eksponowaniem prowadzi być może do tworzenia miejsc w białku decydujących o adhezji płytek, a nieobecnych w natywnej postaci. Korelacja adhezji z ilością adsorbowanego fibrynogenu może ujawnić się w pewnych warunkach przy określonym stężeniu tego białka w odniesieniu do różnego rodzaju powierzchni [27, 43, 112, 113, 124].

Wykazano korelacje reaktywności płytek z ilością przeciwciał do miejsc wiążących fibrynogenu związanych na powierzchni, co pokazuje, że oddziaływanie płytek z powierzchnią jest związane z tymi cząsteczkami fibrynogenu, który jest rozpoznawany przez przeciwciała. Badania z wykorzystaniem przeciwciał dla regionów D i E wykazały dostępność tych miejsc dla wiązania płytek w zaadsorbowanym fibrynogenu [24, 27, 70, 76].

Wpływ rozcieńczenia na konformację białka przekłada się na stopień adhezji płytek. Obserwacje z najsilniejszym wiązaniem przeciwciał rozpoznających region RGDS korelowały z maksymalną adhezją komórek uzyskiwaną dla pośredniego rozcieńczenia osocza. Nie dokumentowano ich jednak przy dokładnie takim samym stężeniu osocza, co wskazuje na istnienie innych miejsc wiążących płytki lub rolę innych białek w adhezji płytek. Przy pełnym stężeniu osocza odnotowano minimalną retencję płytek (pasywacja), natomiast rozcieńczenie dawało przeciwny efekt: maksimum adhezji między stężeniami 0,01% a 0,1%, przy czym maksimum adsorpcji fibrynogenu zarejestrowano dla stężeniu 1% [24, 27].

Znaczenie eksponowania w białkach miejsc wiążących płytki potwierdzają badania, w których obecność niezwiązanych fragmentów RGD peptydów czy dodekapeptydu prowadziła do hamowania przylegania komórek poprzez blokowanie miejsc wiążących integrin płytkowych, podobnie jak sekwencja peptydu PHSRN w fibronektynie, przy czym w procesie przylegania płytek dostępność łańcucha  $\gamma$  fibrynogenu, dla którego miejsce wiążące w receptorze znajduje się w podjednostce  $\alpha$  dostępnej w nieaktywowanych płytkach, wydaje się niezbędną [149]. Przewiduje się udział reszt lizyny jako kluczowych w wiązaniu płytek do fibrynogenu mający miejsce w C końcu łańcuchów  $\gamma$  i  $\alpha$  (domena D) [97]. Przepuszczalnie maksymalny potencjał wiązania płytek jest osiągany podczas ekspozycji obu (RGD z dodekapeptydem) miejsc [24]. Jeśli na powierzchni słabo adsorbują białka i to oddziaływanie nie prowadzi do ich znacznej destabilizacji strukturalnej (bardziej natywna konformacja), to wówczas adhezja płytek następuje w niewielkim stopniu, co obserwuje się na powierzchniach

z hydrofilowego tlenku krzemu, tlenku polietylenu czy z inkorporowanymi grupami fosforylocholinowymi w przeciwieństwie do powierzchni z poliuretanów, gdzie odnotowuje się zwiększoną adhezję [149], przy czym sposób zmian w konformacji w domenie D na hydrofobowych powierzchniach może wpływać na stopień aktywacji płytek [127]. Natomiast na powierzchniach polimerowych wraz z wydłużaniem łańcucha bocznego polimeru płytki przejawiały większą reaktywność określaną na podstawie adhezji, agregacji i sekrecji [97]. Badania wykazują wzrost adhezji płytek wraz ze wzrostem hydrofobowości powierzchni i słabsze przyczepianie się komórek ze wzrostem stężenia białek (lub czasem preekspozycji powierzchni na działanie osocza [155]) z wyjątkiem powierzchni z grupami hydroksylowymi. Jest to wynik silniejszych zmian konformacyjnych białek indukowanych adsorpcją ze wzrostem hydrofobowości i spadkiem stężenia roztworu ze względu na krótszy czas przeznaczony na rozwijanie, przejawiającą się w postaci utraty w większym stopniu struktury  $\alpha$  i wzrostu zawartości struktur  $\beta$ , co sugeruje silniejszą ekspozycję miejsc wiążących do nieaktywowanych płytek [112, 113]. Tak więc pokazano, że im większa utrata  $\alpha$ -helis białka wywołana adsorpcją na powierzchni, tym większa adhezja płytek, a korelacja okazuje się liniowa [43]. Istnieją doniesienia, które potwierdzają te zależności zarówno w przypadku adsorpcji fibrynogenu, jak albuminy, co może zaskakiwać biorąc pod uwagę nieobecność na błonie powierzchniowej płytki receptorów dla albuminy. Pokazano, że w przypadku powierzchni pokrytej albuminą adhezja płytek koresponduje ze stopniem utraty  $\alpha$ -helis powyżej 34%, natomiast poniżej tego poziomu adhezja płytek nie następowała, a albumina funkcjonowała jako czynnik blokujący niespecyficzne oddziaływania [112]. Pasywacja za pomocą albuminy być może wynika z jej większej stabilności konformacyjnej i odporności na indukowane adsorpcją zmiany w porównaniu do innych białek [43]. Zaproponowano, że oddziaływanie albuminy z płytkami podobnie jak dla fibrynogenu w około 50% odbywa się za pośrednictwem receptora dla motywu innego niż RGD, natomiast w czasie rozwijania eksponowane zostają motywy zawierające reszty argininy rozpoznawane przez receptor specyficzny dla sekwencji RGD [112]. Dwa różne warianty oddziaływań receptorów odpowiedzialnych za adhezję płytek do zaadsorbowanych białek potwierdzają obserwacje dokonane z dodanym peptydem RGD lub modyfikacją argininy, w których nie zablokowano adhezji płytek ani wywołanego przyleganiem aktywowanego stanu. Adhezja płytek do albuminy za pośrednictwem receptora z udziałem sekwencji RGD pomimo jej nieobecności w pierwszorzędowej strukturze albuminy jest tłumaczona utworzeniem tej sekwencji na skutek rozwijania białka powyżej krytycznego poziomu poprzez reorientację przestrzenną przeciwnie naładowanych reszt z uformowaniem motywu przypominającego RGD [111].

Jednoczesna obecność obu białek na powierzchni nie pozostaje bez znaczenia w procesie adhezji komórek. Poziom albuminy w zawiesinie zawierającej fibrynogen może modulować stopień zmian morfologicznych aktywowanych płytek. Odnotowano zwiększenie przylegania płytek przy niższym stężeniu albuminy [105].

Okazuje się, że do adhezji nieaktywowanych płytek na powierzchni z zaadsorbowanym fibrynogenem skutkującą aktywacją komórek konieczny i wystarczający jest receptor GPIIb/IIIa. Natomiast w przypadku vWF konieczny jest zarówno GPIIb/IIIa jak i receptor trombiny funkcjonujący także jako receptor dla vWF – kompleks GPIb-IX-V, powiązany z białkami wiążącymi aktywną w szkielecie błonowymi i w którym obszar rozpoznania specyficznego ligandu znajduje się w regionie N-końca części  $\alpha$  GPIb [19, 36, 99, 111]. Żaden z tych receptorów osobno nie jest wystarczający, co pokazuje zależność między tymi dwoma receptorami związaną z procesami regulowanymi przez poziom cAMP. Rozprzestrzenianie się płytek na obu białkach zachodzi bez dodatkowej stymulacji, jednak procesy mają trochę inny przebieg. Początkowe rozpoznanie vWF przez płytki odbywa się wyłącznie poprzez GPIb bez konieczności dodatkowej stymulacji i jest to faza odwracalna kontaktu. Jednak druga faza polegająca na rozplaszczaniu i nieodwracalnej adhezji wymaga już oddziaływania vWF z receptorem GPIIb/IIIa. W stanie spoczynku receptor GPIIb/IIIa jest selektywnym receptorem dla adsorbowanego fibrynogenu i pośredniczy w nieodwracalnej adhezji, generując sygnały tylko częściowo hamowane przez wzrost cAMP i prowadząc do tworzenia pseudopodiów i rozplaszczania. Rolę poziomu cAMP mogą potwierdzać substancje zwiększające cAMP w dużym stężeniu zdolne do całkowitego wyeliminowania adhezji jak i odwracalnej agregacji. Nieaktywowany receptor nie oddziałuje z zaadsorbowanym vWF czy fibronektyną ani witronektyną i aby to nastąpiło, konieczna jest aktywacja GPIIb/IIIa i związana z nią zmiana specyficzności rozpoznawania (powinowactwa), co się dokonuje w konsekwencji oddziaływania GPIb z vWF i towarzyszącej blokadzie wzrostu poziomu cAMP. Oddziaływanie receptorów GPIIb/IIIa z immobilizowanym fibrynogenem i GPIb z vWF powoduje konwersję wolnych GPIIb/IIIa do stanu aktywnego mogącego wiązać rozpuszczalne ligandy [99]. Zmiana ta w przypadku GPIb-vWF prowadzi do nieodwracalnej adhezji i agregacji w przeciwieństwie do fibrynogenu, dla którego nie jest ona konieczna do zajścia nieodwracalnej adhezji mającej miejsce nawet przy niecałkowitej aktywacji w przeciwieństwie do vWF (reorganizacja cytoszkieletu towarzysząca rozplaszczaniu się, ale brak sekrecji serotoniny i agregacji – rozprzestrzenianie i uwalnianie ziarnistości niezależnymi zdarzeniami) [20, 99]. Wskutek aktywacji dochodzi do redystrybucji wielu integryn z wewnątrzkomórkowych ziarnistości i ekspozycji na powierzchni, a w następstwie do tworzenia kolejnych wiązań. Konsekwencją

zablokowania GPIIb zapobiegającego wiązaniu vWF może być znaczące zmniejszenie adhezji i ograniczenie jej do pojedynczej warstwy (brak adhezji kolejnych płytek do płytki monowarstwy) zarówno w przepływie laminarnym jak i zaburzonym [106].

Dominującą rolę receptora GPIIb/IIIa w fundamentalnej adhezji płytek do zaadsorbowanego fibrynogenu czy albuminy potwierdzają eksperymenty, w których jego zablokowanie wykazało silne zahamowanie przylegania komórek niezależnie od stopnia denaturacji białek, przy czym resztkowa odpowiedź adhezyjna sugeruje obecność innych receptorów wspierających tę funkcję płytek lub niecałkowite działanie czynnika blokującego. Dodatkowo badania receptora GPIIb-IX-V nie potwierdzają, by odgrywał on znaczącą rolę jako receptor specyficzny dla sekwencji innej niż RGD, gdyż dodane monoklonalne przeciwciała nie spowodowały znaczącego spadku adhezji płytek zarówno do fibrynogenu jak i albuminy [111].

Aktywacja na powierzchni nie musi prowadzić do nieodwracalnej adhezji. Przytwierdzeniu do powierzchni może towarzyszyć rozprzestrzenianie się i degranulacja, ale mogą pojawiać się względnie słabe zmiany kształtu i uwalnianie ziarnistości. Adhezja płytek na powierzchni może skutkować aktywacją nie tylko komórek przylegających, ale także tych nie znajdujących się w bezpośrednim kontakcie jak np. na powierzchni Biomeru (poliuretanu). Może także, jak to się dzieje na powierzchni polietylenowej, po wstępnej adhezji i aktywacji oraz utworzeniu pojedynczej warstwy przylegających płytek dojść do powstania pasywowującego filmu, który zapobiega osadzaniu i pobudzaniu kolejnych komórek. Brak adhezji komórek nie wyklucza ich pobudzenia wskutek kontaktu z powierzchnią, co można zaobserwować na polialkoholu winylu [41].

Związek między adhezją a stopniem aktywacji płytek częściowo był badany poprzez zablokowanie receptora peptydem RGDS, co zahamowało adhezję na powierzchniach zarówno z grupami  $\text{CH}_3$  i  $\text{OH}$ . W morfologii płytki ukazywały niewielką ilość lub brak filopodiów, uwidoczniły granulomery i pośrednie rozpostarcie. Tym samym wykazano, że ten typ oddziaływania pośredniczy w około połowie oddziaływań i odpowiedzi adhezyjnej występującej razem z silną aktywacją (rozpłaszczanie i wydłużanie filopodiów) oraz że możliwe jest dalsze oddziaływanie z fibrynogenem, ale z mniejszym powinowactwem. Pozostałe oddziaływania następują za pośrednictwem receptorów dla regionów fibrynogenu nie-RGD, które wywołują minimalną aktywację [111, 112, 113]. Podobnie różny stopień aktywacji prezentowały płytki w przypadku albuminy w zależności od oddziaływania z receptorem specyficznym dla RGD czy nie-RGD [111].

Istotnym czynnikiem wpływającym na oddziaływanie płytek z powierzchnią są jony wapnia, który jak wiadomo jest istotny w funkcjonowaniu glikoprotein IIb i IIIa jako receptora fibrynogenu [19,143]. Adhezja płytek w obecności wapnia przejawia postępujące zmiany w postaci zaokrąglania, tworzenia pseudopodiów, centralizacji ziarnistości i rozprzestrzeniania. Obecność związków chelatujących te jony pociąga za sobą brak tych zmian, czasem pojawiają się krótkie pseudopodia. Wapń bierze udział w skracaniu aktomiozyny cytoplazmatycznej, aktywacji aktomiozynowej ATPazy, glikogolizy, aktywności fosfolipazy i fosforylacji białek, które mogą być związane ze zmianą kształtu, ładunku powierzchniowego lub innych czynników istotnych w procesie adhezji. Może być zaangażowany w tworzenie wiązań między płytkami a powierzchnią. Brak wapnia nie uniemożliwia adhezji, ale zdecydowanie ją ogranicza i nie pozwala na rozprzestrzenianie się komórek [143].

### **2.2.3. Szkło jako specyficzna powierzchnia**

Jak wykazano, płytki krwi w zetknięciu z powierzchnią szkła ulegają aktywacji, co jest związane przede wszystkim z wysokim odczynem pH tego materiału. Ta własność jest powszechnie wykorzystywana w różnych metodach badawczych, w których szkło stanowi materiał stosowany do wywołania krzepnięcia krwi czy w procedurze otrzymywania surowicy. Z drugiej strony, aktywacja płytek na szkle jest procesem odwracalnym, co udowodniono przy pomocy sondy fluorescencyjnej określającej poziom jonów wapnia wewnątrz komórek. Aktywacja powoduje uwalnianie jonów wapniowych z układu kanalików gęstych do cytozolu, co wraz z otwarciem kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej prowadzi do gwałtownego, przejściowego wzrostu cytozolowego stężenia  $Ca^{2+}$ . Po początkowym gwałtownym wzroście stężenia wapnia manifestowanym wzrostem fluorescencji zastosowanej sondy następuje wolniejszy spadek jego koncentracji do poziomu początkowego. Udowodniono, że oscylacje cytoplazmatycznego  $Ca^{2+}$  są uniwersalnym trybem sygnałowym aktywującym wiele odpowiedzi komórkowych. Istnieją doniesienia pokazujące, że oscylacje te są skorelowane z tempem przylegania i zmianą kształtu oraz stanem aktywacji (rodzaj podłoża, aktywator) [26]. Pokazano także, że przepływ wapnia odgrywa rolę w szybkości i wielkości tworzenia się agregatów (komunikacja międzykomórkowa) [81] czy różnice we wzorach oscylacji stężenia wapnia podczas adhezji i agregacji [72]. Istotną konsekwencją zmian stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego jest jego wpływ na płynność błony plazmatycznej płytek krwi.

## 2.3. Aktywacja a płynność błony plazmatycznej płytek

### 2.3.1. Zmiany strukturalne zachodzące w czasie aktywacji płytek krwi

Aktywacja i adhezja płytek pociągają za sobą szereg zmian zarówno strukturalnych jak i funkcjonalnych, które mają miejsce podczas przekształcania ze stanu spoczynkowego w aktywowany. Płytki w stanie nieaktywnym przyjmują kształt dysku, który jest skutkiem współdziałania błony lipidowo-glikoproteinowej, szkieletu błonowego i cytoszkieletu aktywnego.

Najbardziej zewnętrzną powłokę płytek krwi stanowi błona lipidowo-glikoproteinowa. Błona plazmatyczna płytek zobrazowana za pomocą niskonapięciowego skaningowego mikroskopu elektronowego o wysokiej rozdzielczości wykazuje pofałdowany wygląd przypominający powierzchnię mózgu. Na powierzchni są także widoczne losowo rozproszone małe otwory układu otwartych kanalików (*open canalicular system*, OCS) połączonych z powierzchnią. Dwuwarstwa lipidowa płytek składająca się z białek, fosfolipidów i obojętnych lipidów o grubości 70-90 Å jest typowa i nie różni się od błon plazmatycznych innych komórek. Jest ona nieściśliwa i nie może się rozciągać, dlatego źródło dodatkowej puli błony wykorzystywanej w zwiększaniu powierzchni rozpostartych płytek w procesie adhezji stanowią drobne fałdy oraz wewnętrzne błony pochodzące z kanałów układu otwartych kanalików. Dodatkowo takie wewnętrzne upakowanie może zwiększać stabilność powierzchni zagrożonej siłami ścinającymi w krążeniu.

Zewnętrzna powłoka błony płytki tworzona przez białka i siarczanowe mukopolisacharydy o grubości 150-250 Å, glikokaliks, jest cieńszy niż u innych komórek krwi i nie stanowi bariery oddzielającej zawartość komórki od środowiska zewnętrznego, ale jest dynamiczną strukturą wyczuwającą zmiany w ciągłości naczyń i odpowiadającą za odpowiedź hemostatyczną płytek. Glikokaliks stanowią receptory glikoproteinowe niezbędne do adhezji płytek do uszkodzonej powierzchni, wywołania całkowitej aktywacji płytki, pobudzenia agregacji i oddziaływania z innymi komórkowymi elementami oraz do przyspieszania procesu retrakcji skrzepu. Zewnętrzną powierzchnię i kanały układu otwartych kanalików pokrywa około 25000 receptorów GPIb-IX i około 80000 receptorów GPIIb-IIIa (integryna  $\alpha$ IIb $\beta$ 3). Oba receptory są mobilne, co jest bardzo ważne dla ich roli w hemostazie.

Układ otwartych kanalików jest nie tylko połączony z błoną powierzchniową, ale sam jest jej wytworem. Kanały OCS są krętymi wgłobieniami błony powierzchniowej drążącymi tunele przez cytoplazmę na kształt serpentyny, które znacząco powiększają całkowitą powierzchnię płytki i stanowią główną drogę przenoszenia produktów z osocza do ziarnistości



$\alpha$ , jak i usuwania produktów zgromadzonych w wydzielniczych organellach w czasie reakcji uwalniania, kiedy dochodzi do połączenia błon i uwalniania substancji do kanałów. Jeśli cząstka, którą płytkę chce zaabsorbować do ziarnistości, jest za duża, płytkę przemieszcza OCS do cząstki tak jak to robi do płaskiej powierzchni.

Najbardziej liczne spośród płytkowych organelli są ziarnistości  $\alpha$ , obecne zwykle w ilości 40-80 na komórkę płytkową. Mogą łączyć się ze sobą, co jest pierwszą oznaką uszkodzeń w czasie przechowywania płytek. Mają kształt okrągły lub owalny o średnicy 200-500 nm. Podzielone wewnątrz na obszary ziarnistości  $\alpha$  magazynują białka adhezyjne, a w swych błonach mają wbudowane receptory glikoproteinowe sprzyjające adhezji do macierzy, szczególnie P-sektynę nieobecną na powierzchni płytek spoczynkowych (niewielką pulę magazynują ziarnistości gęste) jak i pulę głównych receptorów adhezyjnych GPIIb-IX-V i integryn  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Mniej licznymi (średnio 4-8 na płytkę), jednak bardziej zróżnicowanymi wewnątrznie organellami są ciała gęste, które zawierają substancje oddzielone pustą przestrzenią od otaczającej błony.

Dwuwarstwa lipidowa powierzchni błonowej płytek oraz wewnętrzna błona pochodząca z kanałów układu otwartych kanalików są morfologicznie podobne, jeśli nie identyczne jak u innych komórek, jednak różnicę stanowi ich udział w przyspieszaniu koagulacji krwi. Dodatkowo płytki zawierają nieaktywny czynnik tkankowy ukryty w bogatych w cholesterol wyspach lipidowych, które wskutek aktywacji zostają powiązane z zewnętrzną warstwą błony eksponującą anionową fosfatydyloserynę. Jeśli z błony aktywowanej płytki zostaną uwolnione mikropęcherzyki, połączone z nimi czynnik tkankowy może zostać aktywowany [74].

Szczególną rolę strukturalną i funkcjonalną zarówno w stanie spoczynku jak i w czasie aktywacji odgrywa najbardziej liczne spośród wszystkich białek płytkowych, aktyna, która występuje w ok. 2 mln kopii na płytkę, co stanowi około 15-20% całkowitego białka. W stanie spoczynku 40-50% aktyny (ok. 800 tys.) tworzy liniowe polimery zwane filamentami. Aktyna posiada miejsce wiązania ATP lub ADP (kieszek), które utrzymują jej trzeciorzędową strukturę, wpływają na tempo polimeryzacji i gdzie wiązany jest dwuwartościowy kation magnezu lub wapnia. Monomer aktynowy oddziałuje z innymi monomerem w filamencie poprzez trzy funkcjonalne powierzchnie, natomiast czwarta powierzchnia służy do wiązania innych białek. Filament aktynowy tworzy bipolarną podwójną helisę i wykazuje polaryzację, zarówno strukturalną, jak i kinetyczną — posiada szybko rosnący koniec plus (+), zwany kolczastym lub brodatym (ang. *barbed end*) o dziesięciokrotnie większym powinowactwie do monomerów aktyny niż wolno rosnący koniec ostry (ang. *pointed end*), minus (-) w obecności związanego ATP, a w przypadku ADP oba końce mają takie same powinowactwo.

Polimeryzacja aktyny jest procesem zależnym od stężenia monomerów i w stanie spoczynku komórki ilość monomerów przyłączających się do końca plus filamentu jest w równowadze z monomerami odłączanymi od końca minus. Wraz z postępem polimeryzacji i depolimeryzacji monomer aktyny raz przyłączony do końca plus przesuwa się wzdłuż filamentu aż do jego oddysocjowania na końcu minus filamentu. Za zmiany architektury cytoszkieletu aktynowego oraz kontrolę równowagi pomiędzy aktyną w postaci monomerów i filamentów odpowiadają białka wiążące aktynę (ang. *actin binding protein*, ABP). To one regulują dynamikę polimeryzacji aktyny na szereg różnych sposobów: decydują o uwalnianiu monomerów aktyny z kompleksów utworzonych z białkami wiążącymi monomery takimi jak aktyna/profilina czy aktyna/ $\beta$ 4-tymozyna, służą do nakrywania ("czapeczkowania") filamentów (żelsolina, CapZ), odpowiadają za nukleację filamentów i ich rozgałęzianie (kompleks Apr2/3), tworzą nowe miejsca polimeryzacji i „obracają” monomery aktyny (rodzina białek ADP/kofilina) czy stabilizują sieć aktynową (filamina) [10, 74, 90].

W stanie spoczynku, kiedy monomery aktyny występują w stężeniu wyższym od wystarczającego do zachodzenia polimeryzacji, ABP odpowiadają za inhibicję polimeryzacji aktyny poprzez: odseparowywanie monomerów (zmniejszają pulę wolnych monomerów biorących udział w polimeryzacji), czapeczkowanie końca plus mające za zadanie zapobiegać wydłużaniu polimerów oraz zapobiegającą depolimeryzacji stabilizację filamentów wzdłuż ich długości [10]. Same końce plus filamentów mają zdolność inicjowania organizacji aktyny, ponieważ posiadają większe powinowactwo do podjednostek aktyny niż białka używane przez komórkę do ich odseparowania.

W płytkach występują dwa białka o funkcji oddziaływania i izolowania monomerów aktyny. Najliczniejszą z nich jest  $\beta$ 4-tymozyna (0,55 mM), która wiąże monomery aktyny z większym powinowactwem niż koniec minus filamentu ma do monomerów, zapobiegając dołączaniu monomeru do tego końca, ale o mniejszym powinowactwie niż aktyna ma do końców plus, w obecności których uwalnia monomery i tym samym umożliwia tworzenie filamentu przy eksponowanych końcach plus. Ponieważ płytki w spoczynku mają bardzo niewiele eksponowanych końców plus, białko to zachowuje dużą pulę niespolimeryzowanej aktyny – 60% całkowitej aktyny w płytkach jest związana z  $\beta$ 4-tymozyną. Jej powinowactwo do monomeru jest silnie zależne od nukleotydu związanego do aktyny i jest większe w przypadku ATP niż ADP, co sugeruje pierwszeństwo w separowaniu aktyny ze związanym ATP stosownej do przyłączania do końca plus. Drugim z białek izolujących monomery i stymulujących organizację tworzenia aktyny w końcu plus jest profilina (50  $\mu$ M), która jest zdolna do separowania monomerów od końca minus filamentu, ale nie końca plus. Profilina

działa także jako czynnik przenoszący i wymieniający ATP – wymienia ADP na ATP w stabilizowanych monomerach, ułatwiając dodawanie monomerów ATP-aktyna do końca plus filamentu i zwiększając ich zdolność do tworzenia polimerów. PIP2 obniża powinowactwo profiliny do aktyny, prowadząc do jej oddysocjowania, natomiast oddziaływanie z fosfolipazą C powoduje jej dezaktywację na skutek fosforylacji w procesie aktywacji [9, 10, 74].

Białka czapczkujące koniec plus są liczne w płytkach, co świadczy o ich znaczeniu w kontroli dostępności tych końców do regulacji dynamiki aktyny komórkowej. Płytki zawierają w stężeniach 5  $\mu$ M capZ i żelsolinę oraz 3  $\mu$ M adducynę. CapZ i adducyna są aktywne i wiążą wolne tylko istniejące już końce plus z nanomolowym powinowactwem. Żelsolina jest nieaktywna, jeśli poziom wapnia cytozolowego w płytkach nie wzrośnie do mikromolowego stężenia, dlatego w płytkach w spoczynku jest wolna i niezwiązana z cytoszkieletem aktynowym (lub możliwe, że 10% jest w stanie związać się z aktyną [10]), dlatego 98% końców plus jest zakrytych przez 80% całej liczby adducyny i 35% całkowitej capZ [74].

Białkiem bocznie związanym zaangażowanym w utrzymanie dyskooidalnego kształtu jest fosfoproteina stymulowana przez związki naczynioaktywne (*Vasoactive-Stimulated Phosphoprotein*, VASP), która stanowi główny substrat kinaz cAMP i cGMP. W badaniach In vitro wykazano jej zdolność do wiązania się do poliproliny, profiliny, winkuliny. VASP wiąże ze sobą filanty i zapoczątkowuje polimeryzację, która jest nasilana dzięki tej stabilizacji wiązek (także tych filamentów promieniujących z rdzenia) i wykazuje większą aktywność w przypadku aktyny z jonem wapnia niż magnezu. Dzięki niej związane w wiązkę filanty stają się odporne na rozcinanie przez żelsolinę, która może jednak się z nimi wiązać. Ujawniono jej kolokalizację z żelsoliną na krawędzi wiodącej lamelopodium. Powinowactwo VASP do aktyny jest regulowane poprzez fosforylację za pośrednictwem zależnych od cAMP i cGMP kinaz białkowych, która ma miejsce w odpowiedzi na sygnały hamujące aktywację [10].

Filanty aktyny łączą się ze sobą poprzez filaminę i  $\alpha$ -aktyninę w mechanicznie sztywną sieć. Filamina ma v-kształt z miejscami wiążącymi aktynę w wolnych końcach, natomiast bliżej drugiego końca stanowiącego domenę autoasocjacji znajdują się miejsca wiążące wiele innych cząsteczek w pobliżu błony plazmatycznej w tym podjednostkę GPIIb, dzięki czemu większość tego kompleksu receptorowego znajduje się na powierzchni nad cytoplazmatycznymi filamentami. Powiązanie między filamentami aktyny a tym receptorem poprzez filaminę przechodzi przez pory warstwy spektrynowej, tym samym ogranicza ruch jej nici i utrzymuje ją w zwartym stanie. W przypadku kompleksu GPIIb-IIIa nie jest potrzebne białko wiążące się z aktyną, gdyż jest on połączony z podbłonowym cytoszkieletem poprzez

cytoplazmatyczne końce podjednostek  $\alpha$ IIb i  $\beta$ 3 [9, 74]. Innymi białkami stabilizującymi filamenty są tropomiozyna i spektryna [10].

Cytoskielet aktynowy tworzy najbardziej wewnętrzną warstwę powłoki płytki w postaci klatki regularnie oddalonych filamentów aktynowych biegnącej równolegle do płaszczyzny błony. Filamenty aktyny silnie przytwierdzone wzdłuż boków do szkieletu błonowego częściowo poprzez wiązanie ABP z cytoplazmatycznym ogonem GPIIb stanowią zakrzywione wiązki filamentów, które ułożone promieniście wychodzą z centralnego rdzenia włóknistego. Przytwierdzenie szkieletu do błony prawdopodobnie pozwala zachować gładką powierzchnię dyskoidalnego kształtu płytki i powstrzymuje przed tworzeniem pseudopodiów. Ten cytoplazmatyczny cytoskielet dla wszystkich organelli i innych elementów strukturalnych służy jako macierz do ich zawieszenia i utrzymania oddzielnie od siebie i ściany komórki [10, 74].

Zewnętrzną błonę lipidowo-glikoproteinową wspiera znajdująca się zaraz pod nią powłoka tworząca gęstą sieć filamentów aktynowych, spektryny, białek wiążących aktynę i miozyny II mocno przytwierdzona do cytoplazmatycznego ogona transmembranowej glikoproteiny Ib-IX, oddzielająca błonę od organelli z cytoplazmy [10, 74]. Ten złożony szkielet błonowy służy zarówno do stabilizacji błony plazmatycznej jak i zakotwiczenia trójwymiarowego rdzenia włókien aktynowych. To dzięki niemu nadawany jest dyskoidalny kształt płytki w stanie spoczynku i pozwala zachować integralność komórki poddanej dużym siłom ścinającym. To także w tym obszarze domeny cytoplazmatyczne wszystkich transbłonowych receptorów w czasie aktywacji wzajemnie oddziałują z wieloma białkami regulującymi procesy sygnałowe [74].

Do szkieletu błonowego należy oparty na spektrynie szkielet przytwierdzony do cytoplazmatycznej strony błony plazmatycznej i pierścień mikrotubuli biegnący wzdłuż obwodu dysku, do których przytwierdzona jest sztywna sieć usieciowanych filamentów aktyny wypełniających cytoplazmatyczną przestrzeń komórki [74].

Szkielet błonowy oparty na spektrynie to dwuwymiarowy zespół nici spektrynowych łączących się ze sobą poprzez wiązania z filamentami aktyny, dla której cząsteczki spektryny posiadają w każdym końcu miejsce wiążące i połączonych pośrednio do tych włókien poprzez cząsteczki białek wiążących aktynę z kompleksem GPIIb $_{\alpha\beta}$ /IX. Znaczenie wiązania ABP-GPIIb $_{\alpha\beta}$ /IX-włókno aktynowe dla struktury szkieletu błonowego jest widoczne w postaci rozluźnienia i uproszczenia struktury szkieletu po usunięciu włókien aktyny i kompleksu GPIIb $_{\alpha\beta}$ /IX. W płytkach ekspresja spektryny występuje na poziomie 2000 cząsteczek. Sieć spektrynowa różni się od tej w erytrocytach, gdyż nici spektryny łączą się wzajemnie przy

pomocy końców długich filamentów aktyny zamiast krótkich oligomerów, które powstają z filamentów w cytoplazmie, co skutkuje tworzeniem przez warstwę spektryny i sieć aktynową pojedynczej ciągłej ultrastruktury. Erytrocytarną tropomodulinę I czapeczkującą koniec minus i stabilizującą krótkie filamente w płytkach zastępuje kompleks Arp2/3, pozostałe (ok. 2000) końce są wolne, natomiast koniec plus filamentów spoczynkowego cytoszkieletu aktynowego zakrywa adducyna. Adducyna jest fosfoproteiną tworzącą potrójny kompleks z filamentami aktyny i spektryną; w stanie spoczynku płytki jako defosforylowana jest związana ze spektryną w szkielecie błonowym w miejscach, gdzie filamente aktyny są połączone z końcami cząsteczek spektryny [9, 74].

Drugą z sieci włókien stanowiących system wspomagający jest obwodowy pierścień mikrotubuli. Obwodowy pierścień znajdujący się tuż pod błoną plazmatyczną składa się z pojedynczej mikrotubuli owiniętej 8-12 razy, która jako sztywny, pusty polimer tworzy dynamiczną i spolaryzowaną strukturę istotną dla zachowania przez płytkę dyskoidalnego kształtu. W stanie spoczynku połowa tubulin znajduje się w postaci polimeru [74].

Główną fizjologiczną funkcją krążących płytek jest zlokalizowanie uszkodzonych ścian naczyń krwionośnych. Zadanie to jest realizowane poprzez ekspresję receptorów powierzchniowych, które rozpoznają wyeksponowane komponenty tkanki łącznej zwykle pokryte komórkami śródbłonna i/lub poprzez uwalnianie rozpuszczalnych czynników śródbłonna i innych komórek tkanki łącznej przyciągających płytki. Kiedy uszkodzenie zostanie wykryte, płytki natychmiast odpowiadają: przyczepiają się, zmieniają kształt i rozplaszczają się na zniszczonej powierzchni. W czasie aktywacji następuje inicjacja odpowiedzi płytki w postaci: sekrecji, podczas której następuje przeniesienie receptorów adhezyjnych na powierzchnię płytki i uwalnianie mieszaniny agonistów przyciągających i aktywujących kolejne płytki i leukocyty; aktywacji biochemicznego szlaku syntezy i uwalniania tromboksanu oraz aktywacji płytkowych integryn powierzchniowych [74]. Aktywację skutkującą oprócz zmianą kształtu i adhezją, także agregacją, sekrecją czy uwalnianiem mikropęcherzyków błonowych mogą wywołać rozpuszczalni agoniści albo czynniki fizyczne/mechaniczne takie jak wirowanie, filtracja czy mieszanie [96].

Zmiana kształtu przez płytkę stanowi złożony proces oparty na cytoplazmatycznej dynamice polimerów aktyny. Aby doprowadzić do rozpostarcia się komórki, musi nastąpić reorganizacja spoczynkowego cytoszkieletu i utworzenie nowych filamentów aktyny. Za kontrolę tych zmian odpowiadają białka regulujące architekturę i dynamikę aktyny poprzez nadzór dostępności końców filamentów, zapobieganie dodawaniu lub usuwaniu monomerów

bądź wpływ na kinetykę asocjacji, dysocjacji i zawartości nukleotydów monomerów, które jedynie ze związanym ATP mogą skutecznie przyłączać się do końca plus filamentu [10, 74].

Zmiana kształtu następuje wskutek odtwarzalnej czasowej sekwencji. Pierwszym obserwowanym zdarzeniem występującym po kontakcie z powierzchnią jest utrata dyskoidalnego kształtu na rzecz obłego lub sferoidalnego, podczas którego tworzy się pierścień kurczliwy prawdopodobnie za pośrednictwem miozyny wskutek kurczenia się filamentów szkieletu błonowego. Następnie w czasie poniżej 1 minuty obserwuje się przypominające palce wypustki wyrastające z obrzeży komórki. W dalszej kolejności płytki rozplaszczają się na powierzchni, powiększając rozległe lamele, podczas gdy ziarnistości i organelle są ściskane do środka komórki. Na końcu ma miejsce dynamiczna faza ruchliwości błony w różnych miejscach lameli: formowanie i chowanie wewnątrz zmarszczeń. Powstające w centrum komórki filopodia to swoiste zaokrąglone wiązki długich filamentów aktyny wyrastające do krawędzi komórki i biegnące wokół brzegu komórki. Sieć wypełniająca lamellopodium utworzona jest z filamentów aktyny o długości ok. 0,5  $\mu\text{m}$  powstałych z podwojonej puli nowych filamentów aktyny i rozprzestrzenia się między pseudopodiami w czasie 10-30 min. W procesie adhezji pseudopodia mogą się wydłużać i skracać, co jest regulowane lokalnie, natomiast lamellopodium rozrasta się o wiele wolniej, w sposób nieciągły (mogą pojawiać się częste przerwy), a jego cofanie się jest rzadkie. Aktywacja powoduje także reorganizację pierścienia mikrotubuli, który w niektórych komórkach jako zdemontowany resztkowy pierścień mikrotubuli pozostaje częściowo nienaruszony i skompresowany w środku komórki, podczas gdy u innych dochodzi do jego fragmentacji do mniejszych polimerów i formowania nowych całkowicie odmiennych mikrotubuli biegnących z centrum komórki w kierunku nowo rozwiniętych wypustek szczególnie filopodiów. Sekrecja ziarnistości (degranulacja) do OCS po ich centralizacji częściowo zachodzi wskutek utworzenia gęstej korowej sieci aktomiozynowej zapobiegającej zbliżaniu się ziarnistości do błony plazmatycznej i ma miejsce w momencie spowolnienia rozplaszczania jak i w każdym innym czasie w podczas aktywacji. Po rozprzestrzenianiu się w płytkach można rozróżnić cztery morfologicznie i funkcjonalnie odmienne struktury aktynowe – filopodia, lamellopodium, pierścień kurczliwy oraz włókna naprężeniowe [10, 74].

Organizacja błony pokrywającej powierzchnię pseudopodiów na dendrytycznych płytkach jest inna niż nieregularne pofałdowania na dyskoidalnych komórkach. Zwoje w centralnej części dendrytycznej komórki wyprostowują się w długie fałdy. W płytkach w późnej fazie dendrytycznej i początkach rozprzestrzeniania się fałdy zanikają i powierzchnia błony staje się gładka. Pomarszczona powierzchnia komórki spoczynkowej zapewnia zatem

znaczącą ilość błony na pokrycie wydłużeń w czasie przemian w postać dendrytyczną. Pofałdowania wyrównują się do gładkiej powierzchni, kiedy cytoplazma przerzedza się i rozprzestrzenia, prowadząc do zanikania pseudopodiów. Mechanizm generowanej siły będącej u podstaw tworzenia pseudopodiów i rozprzestrzeniania się bazuje na ułożeniu cytoplazmatycznej aktyny. Organizacja nowoutworzonych filamentów w równoległe wiązki wywołuje działania przypominające tarana wypychającego kolczaste wydłużenia powierzchni. Pozawijana powierzchnia może zapewniać znacznie mniejszy opór na jej rozciąganie niż opięta, gładka błona. Organizacja filamentów aktyny blisko ściany komórki tworzy obwodowe sploty pod błoną wymuszające rozprzestrzenianie i wypełnianie przestrzeni między pseudopodiami [38].

Płytki nie mają zdolności syntezy lipidów ani białek, tym samym błona w czasie rozplaszczania się nie pochodzi z syntezy nowej błony. Zmiana kształtu z dyskoidalnego do postaci całkowicie rozpostartej płytki skutkuje wzrostem powierzchni do 420%, do czego głównym magazynem błonowym wykorzystywanym w tym procesie są kanały OCS [38, 74]. Płytki wołowe nie posiadają tego systemu i nie rozprzestrzeniają się, jednak wskutek aktywacji powierzchniowej tworzą pseudopodia i przybierają końcową formę dendrytyczną, która skutkuje podwojeniem powierzchni. Transformacja ta jest możliwa dzięki pofałdowaniom powierzchni przypominającym mózg w stanie spoczynku płytek, które w tym wypadku stanowią główny, jeśli nie jedyny zapas dodatkowej błony służącej do przemian [38].

Dodatkowe źródła błony mogą służyć do uwalniania błonowych pęcherzyków z powierzchni płytki wzbogaconych receptorem błonowym. Podobne pęcherzyki formowane podczas przechowywania mogą świadczyć o uszkodzeniach. Ponieważ proces tworzenie mikropęcherzyków nie powoduje zmniejszenia się objętości płytki, która pozostaje nienaruszona, wewnętrzne błony raczej nie stanowią ich źródła. Prawdopodobnym wyjaśnieniem ich pochodzenia są pofałdowania powierzchni oraz błony otaczające organelle wydzielnicze [38].

W czasie aktywacji dodatkowo dochodzi do translokacji receptorów błonowych. Kompleksy receptor-ligand (znakowane) są przemieszczane przez błonę powierzchniową i przenoszone do kanałów OCS, a w przypadku ich tworzenia w aktywowanej płytce: w komórkach dendrycznych przemieszczane z pseudopodiów i ciał płytek do kanałów OCS, w rozpostartych komórkach – z peryferyjnych krawędzi do centralnej części płytek. Różnice te tłumaczy wypychanie z wnętrza większości kanałów OCS, by stały się częścią powierzchni rozpostartej komórki albo ich kompresowanie podczas rozpościerania (nie dostępne dla znacznika). W przypadku gdy tworzy się nieruchomy kompleks receptor-ligand (np.

z elementami uszkodzonego naczynia), który nie może zostać przemieszczony przez błonę do kanałów OCS, i zostanie pobudzone szybkie tworzenie i układanie nowej sieci aktynowej w procesie rozprzestrzeniania się płytek, dolna część powierzchni i błony wyścielające kanału OCS mogą się przemieszczać przez nieruchome kompleksy [74].

Proces zaokrąglania jest indukowany krótkotrwałym wzrostem stężenia wapnia cytozolowego następującego po wiązaniu liganda z receptorem, które skutkuje deformacją bądź innym zaburzeniem błony, powodując aktywację wewnątrzkomórkowego enzymu fosfolipazy C. Enzym ten katalizuje hydrolizę związanych z błoną polifosfoinozytydów (w tym fosfolipidów dwufosforanu fosfatydyloinozytolu PIP<sub>2</sub>) znajdujących się po wewnętrznej stronie błony plazmatycznej na utworzenie dwóch drugorzędowych/wtórnych przekaźników, diacyloglicerolu i trifosforanoinozytolu. Pierwszy z nich, diacyloglicerol DAG, pozostaje po wewnętrznej stronie błony i razem z fosfatydyloseryną aktywuje kinazę białkową C zależną od wapnia, która fosforyluje wiele innych białek. Drugi z nich, rozpuszczalny trifosforan inozytolu (trifosforanoinozytol, IP<sub>3</sub>) łatwo dyfunduje w cytoplazmie do receptorów w gęstym systemie i wiążąc się z nimi inicjuje uwalnianie zmagazynowanego wapnia, co powoduje wzrost jego poziomu do blisko mikromolowego. Procesy te z kolei prowadzą do uwalniania kwasu arachidonowego z glicerofosfolipidów, który ulega enzymatycznej konwersji do labilnych hydroksyperoksydaz, prekursorów stabilnych prostaglandyn oraz tromboksanu A<sub>2</sub>, oraz aktywacji białek oddziałujących z produktem kinazy-3 fosfatydyloinozytolu, trifosforanem fosfatydyloinozytolu PIP<sub>3</sub>, takich jak kinaza białkowa B [96, 69, 45, 74]. Dalsze zwiększenie stężenia wapnia do ok. 10 μM może nastąpić po otwarciu kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej. Fosfolipaza C $\beta$  aktywowana jest przez  $\beta\gamma$ -podjednostkę trimerycznych białek G sprzężonych z powierzchniowymi receptorami serpentykowymi takimi jak rodzina receptorów aktywowanych proteazą, receptory ADP czy serotoniny. Natomiast fosfolipaza C $\gamma$  aktywowana jest przez domeny z motywem aktywacji immunoreceptora opartym o tyrozynę (ITAM) w  $\gamma$ -podjednostce związanej z receptorem kolagenu GP-VI i płytkowym receptorem Fc $\gamma$ RIIA poprzez fosforylację [74].

Zaokrąglenie jako początkowy skutek stymulacji płytki zależy od depolimeryzacji istniejących filamentów, czyli ich demontażu i skracania, które prowadzi do zmiany kształtu wywołanej przez wszystkich agonistów. Etap ten jest bardzo krótki i wywołany na drodze dwóch zdarzeń: rozcinania istniejących filamentów oraz chemicznych zmian białek wiążących się z aktyną w postaci fosforylacji, defosforylacji, proteolizy, inhibicji lub aktywacji oddziaływania z aktyną poprzez małe białka G i metabolity takie jak jony wapnia czy PIP<sub>2</sub>, prowadząc do reorganizacji filamentów na skutek odkrywania nakrytych końców plus [10].



Białkiem aktywowanym napływem jonów wapnia do przebudowy cytoszkieletu jest żelsolina. To globularna cząsteczka o masie 81 kDa i występująca w ilości 20000 kopii na komórkę, zbudowana z sześciu powtarzanych motywów, posiadająca liczne domeny wiążące wapń, dwa miejsca wiążące aktynę, z których jedno nakłada się na domenę wiążącą fosfolipidy. Przy nieobecności wapnia powtórzenia fałdują się między sobą tworząc globularną strukturę z izolowanymi miejscami wiążącymi aktynę, dlatego żelsolina nie może się do niej wiązać. Związanie wapnia powoduje otwarcie cząsteczki i pozwala na dostęp aktyny do jej miejsc wiążących, które współdziałają ze sobą, wywołując proces niekowalencyjnego rozcinania filamentów aktyny – żelsolina najpierw wiąże się wzdłuż filamentu za pomocą jednego z miejsc, co aktywuje drugie z nich, prowadząc do jego wstawienia w filament i pośrednicząc w procesie przerywania, co doprowadza do szybkiego spadku ilości polimerów. Po fragmentacji filamentu żelsolina pozostaje związana z końcem plus filamentu tym samym zapobiegając jego wydłużaniu i być może wzmacniając depolimeryzację z końca minus. W ten sposób żelsolina tworzy końce minus filamentów podczas ich rozcinania. Oddysocjowanie żelsoliny od aktyny może być wywołana jedynie przez rodzinę fosfoinozydów i kwas lizofosfatodowy. Kinetyka kompleksowania żelsoliny z aktyną odpowiada uwalnianiu wapnia, fragmentacji filamentów i zaokrągłaniu komórki. Oddziaływanie żelsoliny i aktyny jest częściowo odwracalne i ok. 50% całej żelsoliny dysocjuje od aktyny, eksponując koniec plus filamentu, co koreluje z czasem maksymalnej organizacji filamentów aktyny w płytce [10, 74].

Innym białkiem zaangażowanym w działanie demontujące polimery i współgrającym z żelsoliną w aktywności depolimeryzującej jest kofilina (czynnik depolimeryzujący aktynę). Wiązanie kofiliny do podjednostek aktyny w filamentach powoduje ich destabilizację prowadzącą do uwolnienia z filamentu, skutkującą zwiększeniem utraty monomerów z końca minus bez wpływu na koniec plus. Aktywność kofiliny (jej koncentracja w płytce wynosi ok. 30  $\mu$ M) regulowana jest przez fosforylację, która zapobiega jej wiązaniu do aktyny. W płytce w stanie spoczynku duża frakcja kofiliny jest fosforylowana i tym samym nieaktywna, natomiast stymulacja komórki powoduje poprzez wapń, niezależnie od białkowej kinazy C, i poprzez GTP S aktywujące białka G jej szybką defosforylację, którą może utrzymać w stosunkowo długim czasie w przypadku przyłączenia liganda do receptorów integrynowych [10, 74].

Konsekwencją działania żelsoliny i kofiliny jest dysocjacja połączenia promieniujących z rdzenia filamentów od szkieletu błonowego, który zostaje także demontowany. Odłączanie przez żelsolinę włókien od ABP-GPIb-IX jest efektywnym mechanizmem oddzielania szkieletu błonowego od większości połączeń włókien aktynowych [10, 74].

W czasie aktywacji połączona z filamentami aktyny i spektryną adducyna jest fosforylowana w Ser726, co skutkuje odłączeniem spektryny od aktyny, ułatwia centralizację spektryny i prowadzi do ekspozycji końców plus filamentów aktyny, które mogą brać udział w przekształcaniu spoczynkowego kształtu dyskooidalnego w postać aktywowaną. Krótkie włókna aktynowe pozostają powiązane z błoną poprzez połączenia z ABP i spektryną, dostarczając przestrzenną informację dla nowego ułożenia [9, 74]. Jednocześnie aktywacja zależnych od wapnia proteaz takich jak kalpaina prowadzi do hydrolizy spektryny i białek wiążących aktynę w szkieletcie błonowym, który dzięki temu staje się luźniejszy i elastyczny. Od aktywności kapaliny zależy także powstawanie klastrów integrynowych, których tworzenie jest istotne do aktywacji małych białek G, Rac i Rho, jak również jest ona konieczna do sekrecji, indukowanej trombiną agregacji i całkowitego rozpląszczenia na szkle [10].

W procesie zaokrąglania mają swój udział także białka kurczliwe, głównie miozyna II związana z błonowym cytoszkieletem, która staje się molekularnym motorem poddającym filamenty aktyny sile wywołującej skurczenie [10, 74]. W płytkach ekspresję wykazują dwie formy miozyny II, która ma zdolność do samoagregacji w postaci małych bipolarnych filamentów o długości ok. 200 nm. Jako heksametr składa się z dwóch długich ciężkich łańcuchów oraz dwóch par lekkich łańcuchów. Jej aktywność jest regulowana przez fosforylację jednej z pary lekkich łańcuchów, co pobudza zmianę konformacyjną sprzyjającą tworzeniu filamentów. Główny szlak prowadzący do aktywności kinazy lekkiego łańcucha miozyny opiera się na wapniu/kalmodulinie, gdy po aktywacji płytki dochodzi do gwałtownej fosforylacji miozyny II w czasie maksymalnej mobilizacji wapnia. W drugim szlaku mała GTPaza rhoA wiąże i aktywuje Rho kinazę, która pobudza fosforylację lekkiego łańcucha miozyny poprzez fosforylację i inhibicję fosfatazy lekkiego łańcucha miozyny [74]. Aktywacja miozyny towarzyszy zmianie kształtu i prawdopodobnie bierze udział w skracaniu filamentów korowych w czasie zaokrąglania, ściąganiu ich do centralnego rdzenia w mikrofilamentową powłokę (pierścień kurczliwy), który jako uformowany pierścień aktynowy centralizuje ziarnistości, wskazując na tę funkcję miozyny o znaczeniu wydzielniczym. Widać zatem, że siła ściągająca filamenty aktyny działa we wczesnym etapie procesu aktywacji nawet przez zakończeniem organizowania się filamentów aktyny. Miozyna odpowiada również za modulację struktury błonowej receptorów czy kontrolę klastrowania receptorów integrynowych – jej aktywność jest konieczna do zmniejszenia ekspresji kompleksu GPIIb-IX-V z powierzchni płytek w zawieszynie. Z drugiej strony inhibicja miozyny ma mały wpływ na reakcję budowania filamentów aktyny czy samą zmianę kształtu [10, 74].

Przeprowadzony demontaż filamentów powoduje, że 1) sztywny cytoszkielet dyskoidalnej komórki jest niszczone, co pozwala na tworzenie nowych struktur i deformacje błony dla wypustek; 2) wzrasta stężenie monomerów odrywanych od końców minus filamentów jak i tych uwalnianych z białek je wiążących w wyniku zmniejszenia powinowactwa. Pozwala to w kolejnym etapie zmiany kształtu płytki na tworzenie filopodiów i lamellopodiów w wyniku reorganizacji i polimeryzacji aktyny. Reakcja formowania nowych filamentów, podczas której podwaja się zawartość komórkowa filamentów, jest napędzana po wiązaniu liganda z receptorem dzięki generowaniu miejsc nukleacji w odpowiednikach wolnych końców plus pochodzących z dwóch źródeł:

1. Odslanianych końców plus filamentów wcześniej izolowanych poprzez usuwanie białek czapczkujących jak i uwalnianie nakrytych przez żelsolinę końców plus podczas wzrostu stężenia metabolitu fosfolipazy C $\gamma$ , PIP2;
2. Nukleacja de novo filamentów wskutek aktywacji kompleksu Arp2/3 [10, 74].

Białka czapczkujące regulują rozrost z końca plus. Zadaniem capZ jest zakończenie formowania się filamentów aktyny, czego odzwierciedleniem jest zmiana jego zawartości w cytoszkielecie aktywowanej płytki, która stale rośnie podczas tworzenia nowych filamentów aktyny do momentu, gdy ok. 60% capZ jest związana przy osiągnięciu przez zawartość filamentów aktyny plateau na poziomie 80% całości. Adducyna pomaga rozpocząć reakcję budowania filamentów poprzez dysocjację od szkieletu aktynowego w czasie aktywacji komórki, tym samym zmniejszając pulę związanego z aktyną białka do minimum na poziomie 25% po zakończeniu formowania filamentów. Żelsolina także odgrywa istotną rolę w produkcji nowych końców filamentów dla reakcji organizacji aktyny w aktywowanej płytce. Indukowane wapniem rozcinanie zwiększa liczbę filamenów (i końców plus) 5-10-krotnie. Duża frakcja żelsoliny, która w pierwszych sekundach po aktywacji płytki jest cała związana z aktyną, częściowo dysocjuje, co czasowo koreluje z czasem maksymalnego tworzenia filamentów aktyny. Uwalnianie końców plus pozwala na wydłużanie niezakrytych filamenów i ich rozbudowywanie [10, 74].

Białka nakrywające końce plus są nieaktywne, kiedy są związane fosfolipidami błonowymi z grupy fosfoinozytydów, które dzięki zawartości D3 i D4 działają jako inhibitory. W stanie spoczynku płytki zawierają niewiele fosfoinozytydów z D3, natomiast te z D4 stanowią ok. 1-2% z całkowitej liczby lipidów błonowych, co zmienia się po stymulacji płytki wskutek aktywności fosfolipazy C prowadzącej do zwielokrotnienia tej puli. Aktywacja płytki stymuluje także działanie kinazy PI-3, a stężenia fosfoinozytydów z D3 zwiększają się drastycznie po przyłączeniu liganda do receptora, ale nie więcej niż do 2-5% wszystkich

fosfoinozytydów/ok. 50000 na płytkę. Fosfoinozytydy mają związek z reakcją tworzenia aktyny. Ich synteza koreluje z czasem maksymalnej organizacji aktyny. Zablokowanie ppIs skutkuje zahamowaniem tworzenia końców plus i/lub tworzenia aktyny. Służą nie tylko do bezpośredniego zainicjowania budowania filamentów aktyny, lecz także do kierowania tej struktury w obszar oddziaływania cytoszkieletu z błoną, gdyż cała organizacja filamentów rozpoczyna się właśnie tuż pod błoną plazmatyczną [74].

Nukleacja nowych filamentów jest sterowana dzięki kompleksowi Arp2/3, 2E4/kaptynie i innym układom. Kompleks Arp2/3 (*actin-related protein complex*) stanowi strukturę potrzebną na wszystkich etapach zmiany kształtu po zaokrągleniu. Zbudowany jest z siedmiu polipeptydów, z czego dwa są członkami rodziny białek aktynozależnych i posiadają sekwencje wiążące aktynę zwane Arp2 i Arp3, a pięć pozostałych podjednostek ARC (1-5) ma mniejszą masę cząsteczkową i jest silnie chroniona. Wykazuje on dużą ekspresję w płytkach na poziomie 2-10  $\mu\text{M}$ , a 25-30% jego puli jest wiązana do spoczynkowego cytoszkieletu, którego jest znaczącym składnikiem. Po aktywacji płytki cytoszkielet aktynowy zostaje wzbogacany w ten kompleks 3-krotnie, koncentrując się przede wszystkim na obrzeżach komórki w obszarach nowego formowania aktyny, której filamety kierowane są na zewnątrz ku błonie, dlatego został zlokalizowany w krawędzi wiodącej i punktach sieci aktynowej lamellopodium. Aktywne kompleksy Arp2/3 naśladują końce minus filamentów aktyny, by indukować wzrost filamentów w kierunku plus, dlatego kompleks ten może także wiązać i zakrywać koniec minus wcześniej utworzonych filamentów [10, 74]. Nukleacja polimeryzacji z końca minus filamentów może być zwiększana poprzez wiązanie do boków istniejących polimerów i rozgałęzianie filamentów zarodkowanych przez Arp2/3. Ponadto kompleks ten może powodować dodawanie do końca plus istniejących polimerów i tworzenie rozgałęzień rosnących w każdym z ramion. W płytkach w stanie spoczynku VASP, tropomiozyna i inne białka bocznie związane z aktyną mogą hamować aktywację tego kompleksu poprzez blokowanie miejsc wiążących. W trakcie transformacji formy z dyskoidalnej do zaokrąglonej filamety zostają rozcinane za pośrednictwem aktywowanej wapniem żelsoliny pozostającej związanej z końcem plus, zakrywając go i zapobiegając repolimeryzacji, czemu towarzyszy oddysocjowanie białek bocznie związanych. Tym samym spadek stężenia bocznie związanych białek i umożliwienie wiązania do boków istniejących krótkich filamentów prowadzi do aktywacji i wzmocnienia zdolności nukleacji kompleksu Arp2/3, za którego pośrednictwem krótkie filamety przy powierzchni błony mogą służyć za miejsca polimeryzacji aktyny, powodując rozrost lamellopodium jako warstwy krótkich filamentów. Być może dla działania

kompleksu Arp2/3 niezbędne są białka nakrywające i kofilina, z którymi oddziałując i biorąc udział w tworzeniu sieci aktynowej razem odgrywają rolę w formowaniu lamellopodium. [10].

Różne szlaki sygnałowe regulują aktywność tego kompleksu. Zablokowanie samego Arp2 powoduje zahamowanie polimeryzacji aktyny, a inhibicja ARC2 blokuje wprawianie w ruch krawędzi wiodącej, ale nie wpływa na polimeryzację. Składniki komórkowych miejsc adhezji, winkulina i zyxina, zawierają domeny wiążące ten kompleks, co sugeruje rolę tych białek w jego aktywacji w miejscach adhezji. Aktywność kompleksu Arp2/3 mogą silnie zwiększać także członkowie rodziny białek syndromu Wiskott-Aldrich (WASp), które po zmianie konformacji następującej po wiązaniu cdc42, polifosfoinozytydów czy białek zawierających domeny SH3 odsłaniają miejsca wiążące kompleks Arp2/3, choć same WASp nie odgrywają roli w fizjologicznej aktywacji polimeryzacji aktyny w płytkach ludzkich [10, 74]. Innym białkiem zdolnym do jego aktywacji jest wykazująca ekspresję w płytkach kontraktyna, która w czasie aktywacji komórki jest fosforylowana [74].

Kaptyna/2E4 lokalizuje się na brzegach lamellopodium i jest być może czuła na podjednostki aktyny ze związanym ATP. Wiążąc się z końcami filamentów wzmacnia polimeryzację i reguluje wzrost z końca plus. 2E4/kaptyna stanowi jeden z czynników kontrolujących aktywność Arp2/3 w wydłużaniu końca plus, ale sama ma także zdolność nukleacji nowych filamentów.

Oprócz aktywności depolimeryzującej kofilina wykazuje zdolność regulacji wzrostu filamentów z końca minus, utrzymując je tej samej długości. VASP i inne sieciujące białka ponownie wiążąc się z nowymi filamentami organizują filopodia [10].

Filamenty aktyny są dynamiczne, ich tworzenie w jednym obszarze pociąga za sobą ich demontaż w innym regionie. Ta przebudowa jest kontrolowana przez wiele czynników. Ukierunkowanie końca plus budowanego filamentu jest prowadzone przez hydrolizę ATP – w miarę starzenia się filamentów ATP jest hydrolizowane z uwolnieniem nieorganicznego fosforu i pozostawieniem podjednostek ze związaną cząsteczką ADP, które są rozpoznawane przez wiele białek zaangażowanych w przyspieszanie procesu rozbierania filamentów aktyny, wśród których najważniejsze są białka tnące filamente, żelsolina i kofilina. Zarówno żelsolina jak i kofilina mają większe powinowactwo do podjednostek aktyny związanej z ADP w porównaniu z ATP, co kieruje je do starych filamentów [74].

Płytki są elementami generującymi siłę do obkurczania się skrzepu, dlatego w późniejszym etapie adhezji w płytkach wytwarzane są włókna naprężeniowe i płytki adhezyjne. Jest to konsekwencją aktywacji układu przytwierdzenia poprzez receptory lub ich ligandy, która generuje sygnały do komórki inicjujące kaskadę zdarzeń. Glikoproteina Ib

w kompleksie GP1b-IX mocno związanym ze szkieletem błonowym oddziałując z aktywowanym ligandem vWF wywołuje aktywację receptorów integrynowych. Receptory integrynowe po związaniu np. z fibronektyną generują sygnał do rekrutacji białek cytoplazmatycznych i błonowych do miejsca adhezji, gdzie tworzone są płytki adhezyjne zawierające szereg białek strukturalnych jak VASP, talinę, filaminę, ABP,  $\alpha$ -aktynę, zyxinę, paxcylinę, tensynę, miozynę, skeleminę i winkulinę. Jednocześnie aktywacja powoduje klastrowanie tych receptorów (np.  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) być może poprzez oddziaływanie z miozyną II, czemu towarzyszy akumulacja filamentów aktyny, do których receptory zostają przywiązane za pomocą oddziaływań z białkami miejsca adhezji. Dochodzi do polimeryzacji aktyny i organizacji filamentów w bardziej uporządkowane struktury jak włókna naprężeniowe. Spośród białek wiążących aktynę w płytkach adhezyjnych szczególnie duże znaczenie także dla tworzenia włókien naprężeniowych ma VASP oraz  $\alpha$ -aktylina, która stabilizuje filanty, wiąże cytoplazmatyczne ogony receptorów z aktyną, stanowiąc most wiążący przytwierdzenie powierzchniowe z cytoszkieletem, i przekazuje informacje o przytwierdzeniu komórki. Oddziaływania te regulowane są przez wapń, PIP2 i PIP3, a fosforylacja zmniejsza powinowactwo do filamentów aktyny [10, 74].

### **2.3.2. Zmiany błonowe indukowane agonistami i ich znaczenie**

Poddanie płytek krwi działaniu agonistów nie pozostaje obojętne dla stanu błony komórek. Reakcją na ich funkcjonowanie może być wzrostu przepuszczalności jonów wapnia, które modułują odpowiedź na agonistów czy aktywność związanej z błoną ATPazy i cykazy adenylowej [98]. W procesie aktywacji może także dojść do utraty asymetrii błony i ekspozycji anionowej fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie, która zapewnia powierzchnię dla konwersji protrombiny w trombinę w kaskadzie krzepnięcia [11, 69, 74]. Ze zmianą tą skorelowana jest degradacja białek cytoszkieletu przez zależną od jonów wapnia proteazę płytkową kalpainę, która może prowadzić do spadku oddziaływania z fosfatydyloseryną i tym samym umożliwiając temu lipidowi udział w przemieszczaniu w poprzek błony [11].

Procesy te jako reakcja błony na pobudzenie są zależne od jego natury i stanu błony jak i zintegrowania enzymatycznych odpowiedzi oraz funkcji poprzez reorganizację konfiguracji błony, a tym samym zmiany polarności i dynamiki lipidów. Płynność błony plazmatycznej stanowi zatem jeden z czynników decydującym o wrażliwości płytek [45, 78].

Średnią odpowiedzią błony na stymulację agonistami jest jej usztywnienie. Zmniejszenie płynności błony na skutek aktywacji okazuje się jednak zjawiskiem przejściowym

występującym w czasie inicjacji szlaków sygnałowych prowadzących do agregacji i sekrecji [45, 78, 119].

Indukowanemu trombiną rozkładowi PIP<sub>2</sub>, mobilizacji kwasu arachidonowego prowadzącego do syntezy prostaglandyn, zwiększonej przemianie fosfolipidów i fosforylacji lipidów, uwalnianiu wapnia wewnątrzkomórkowego i serotoniny z ziarnistości, zmianie kształtu, agregacji towarzyszy dezorganizacja błony manifestowana w postaci spadku parametru jej uporządkowania [78, 91]. Procesy te zaobserwowano niezależne od obecności zewnątrzkomórkowych jonów wapnia, gdyż zastosowanie jonoforu nie skutkowało oddziaływaniem na organizację strukturalną błony czy PIP<sub>2</sub> [91, 92]. Trombina jednak nie wywołuje zmian uporządkowania aminofosfolipidów, nie eksponując fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie, co ma miejsce dopiero w przypadku trombiny w obecności kolagenu [11, 69, 78]. Wzrost sztywności lipidów błonowych zaprezentowano podczas wiązania płytkowego receptora z fibrynogenem [66] czy przyłączania aktywatora rekombinowanego tkankowego plazminogenu (rt-PA) [141]. Istnieją doniesienia wykazujące różnice w zmianach w części białkowej i lipidowej. W części białkowej po początkowym wzroście płynności ujawniono długotrwały usztywnianie, co było interpretowane jako chwilowy wzrost mobilności w białkowej części błonowej wskutek wiązania trombiny, czego nie zanotowano w przypadku ADP i kwasu arachidonowego, a w dalszej kolejności rejestrowano trwający 8-10 minut spadek płynności. W części lipidowej natomiast początkowe usztywnienie zanikało w czasie 120 s, a błona odzyskiwała swój wyjściowy poziom płynności po 12-16 minutach [119]. Istnieją jednak doniesienia o braku zarejestrowanych zmian w organizacji lipidów wywołanych oddziaływaniem z trombiną [95]. Można znaleźć również dowody o odwrotnym skutku aktywacji w postaci spadku parametru uporządkowania w czasie agregacji indukowanej trombiną, ADP czy epinefryną, który był hamowany przez aspirynę [83, 91, 92]. Inny agonista, czynnik aktywujący płytki PAF, powodujący stymulację GTPazy, przejściowy wzrost wewnątrzkomórkowego Ca<sup>2+</sup>, sprzężenie cykazy adenylanowej i fosfolipazy C oraz fosforylację białek, powodował ograniczony czasowo wzrost uporządkowania lipidów zewnętrznej warstwy i spadek jej mikroheterogenności [45].

Demonstrowany wzrost uporządkowania może wynikać ze zmian metabolizmu lipidów poprzez aktywację endogennych fosfolipaz albo z redystrybucji błonowych białek w czasie aktywacji [45, 78]. Po krótkotrwałym początkowym spadku swoboda ruchowa macierzy lipidowej wzrasta, co może zwiększać oddziaływania między białkami, ułatwiać tworzenie kompleksów białek błonowych (klasteryzacja jest procesem zależnym również od jonów wapnia) i tym samym prowadzić do zmniejszeniem mobilności pojedynczych receptorów,

które być może częściowo są kontrolowane przez białka cytoszkieletu [78, 119]. Wzrost mikrolepkości traktowany jako średnia odpowiedź sygnalizuje wzrost oddziaływań między lipidami i gęstości upakowania, co nie wyklucza lokalnych zmian o innym charakterze. Zwiększenie oddziaływań między białkami może w konsekwencji wpływać na lipidy błonowe [78].

Niewykluczone, że usztywnienie błony świadczy o roli lipidów w modulacji receptorów błonowych jako następstwa wzrostu oddziaływań w postaci większej ekspozycji białek (razem ze spadkiem płynności zaobserwowano zwiększenie ekspresji receptorów trombiny). Rezultatem takich zmian może także być silniejsze wystawienie błonowych fosfolipidów na endogenną fosfolipazę. Jest to wynik aktywności płytkowej fosfolipazy A<sub>2</sub>, która jest kontrolowana przez stan fizyczny substratowych fosfolipidów i zostaje pobudzona przy zwiększonej mikrolepkości. Jeśli procesy te zachodzą w nieaktywowanych płytkach, to przypuszczalnie pierwszy etap złożonego procesu agregacji (zwiększenie dostępności kwasu arachidonowego do syntezy prostaglandyn) nadzorowany jest przez fizyczny stan lipidów błonowych [78]. Aktywacja błonowych fosfolipaz powoduje szybkie zmiany zachowania fazowego błony, zmiany w domenach i inhibicję lub aktywację białek błonowych [45].

Możliwe, że wiele związanych z błoną funkcji jest zależnych od struktury lipidów lub/i płynności np. transport jonów i glukozy, wiązanie pewnych hormonów, aktywność ATPazy zależnej od jonów magnezu, sodu czy potasu, wrażliwej na hormony cyklicznej adenylowej. Istotną rolę odgrywają tutaj jony wapnia. Zewnątrzkomórkowy wapń jest niezbędny w reakcjach sekrecji, agregacji czy adhezji, natomiast jony wapnia cytozolowego biorą udział w regulacji mobilności lipidów. Stymulacja trombiną, ADP czy epinefryną powoduje redystrybucję komórkowego wapnia (stopniowy wzrost mobilizacji i napływu), którego zmiany udziału powierzchniowego mogą równocześnie modyfikować płynność błony plazmatycznej – zmniejszenie ruchliwości lipidów i zwiększenie sztywności błony być może następuje poprzez wzmacnianie wiązania wapnia do błony. Działanie wapnia za pośrednictwem zmniejszania płynności lipidów może wpłynąć na wiele funkcji błonowych, co może także rzutować na odpowiedź płytek na czynniki zewnętrzne. Wydaje się, że wpływ jonów wapnia na płynność lipidów jest istotny w utrzymaniu strukturalnej i funkcjonalnej integralności błony powierzchniowej krążących nieaktywowanych płytek [98].

Zaburzenie struktury dwuwarstwy i związane z nią zmiany płynności może pojawiać się w trakcie fuzji błony w czasie uwalniania błonowych mikropęcherzyków [11] czy procesie sekrecji wewnątrzkomórkowych ziarnistości [67, 78, 98]. Z drugiej strony fluktuacje płynności błony i/lub poziomów wapnia związanego w miejscach błonowych mogą znacząco



oddziaływać na fuzje wewnątrzkomórkowych ziarnistości z błoną plazmatyczną w aktywowanym procesie sekrecji [98].

Istnieją dowody wpływu fizjologicznego stanu lipidów błonowych na aktywność wrażliwej na wapń błonowej cyklazy adenylanowej, której produkt cAMP jest silnym inhibitorem agregacji. Cyklaza adenylanowa jest aktywowana przez inhibitor prostaglandynę E1, a hamowana przez ADP czy epinefrynę. W warunkach dramatycznie zwiększonej mikrolepkości błony plazmatycznej dochodzi do zapobiegania stymulacji cyklazy, której aktywność zmniejszają także jony wapnia bezpośrednio bądź poprzez zmniejszanie płynności błony [98].

### **2.3.3. Zmiany w stanach patologicznych**

Znaczenie płynności błony płytek dla ich funkcjonowania szczególnie jest widoczna w zmodyfikowanych lub patologicznych stanach. Pobudzający wpływ usztywnienia błony na agregację płytek mogą indukować poza jonami wapnia także inne kationy [55, 98]. Usztywniające działanie lantanu, jego zdolność do wywoływania agregacji i sekrecji, ale i hamowania napływu i wiązania z błoną zewnątrzkomórkowego wapnia sugerują również, że względnie sztywna błona może pobudzać agregację płytek. Zmiany strukturalne lipidów pod wpływem temperatury nie muszą być takie same jak po dodaniu kationów, które być może powodują reorganizację strukturalną lipidów (separacja) [98].

Aktywacja dopełniacza prowadzi do zmniejszenia mikrolepkości błony (bardziej płynna) i uporządkowania lipidów (zaburza oddziaływanie między lipidami), co skutkuje lizą komórek [104]. Płytki, których błony było wzbogacone w cholesterol i tym samym charakteryzowały się zwiększoną mikrolepkością lub pochodziły od dawców ze zmianami patologicznymi analogicznie zmieniającymi płynność błony, silniej odpowiadały na czynniki agregujące (zwiększona wrażliwość na epinefrynę i ADP) i wykazywały większą sekrecję [55, 78, 98, 102]. Efekt przeciwny był osiągnięty poprzez zubożenie błony w cholesterol lub inkubację komórek z alkoholem – wzrostowi płynności i inhibicji agregacji nie towarzyszył wpływ na mobilizację jonów wapnia [55, 98]. Błony płytek krwi pochodzących od pacjentów z chorobą Alzheimera prezentują zwiększoną płynność [154], w przeciwieństwie do płytek krwi pochodzących od pacjentów z cukrzycą typu 2 [139].

### **2.3.4. Metody badań płynności błony**

Informacje na temat właściwości błony plazmatycznej płytek uzyskuje się za pomocą sond fluorescencyjnych lub sond (znaczników) spinowych, które wprowadzone do środowiska lokują się w części błony zależnej od fizykochemicznych cech cząsteczek.

Przy zastosowaniu sond fluorescencyjnych dokonuje się rejestracji intensywności i anizotropii (polaryzacji) fluorescencji. Badania wykazały, że wzrost intensywności fluorescencji koreluje z sekrecją serotoniny, natomiast anizotropia monitorująca zmiany płynności błony jest związana ze zmianą kształtu płytki. Polaryzacja fluorescencji odzwierciedla mikrolepkość lub anizotropową naturę błonowej dwuwarstwy lipidowej i w przypadku lipofilowych sond jest czuła na zmiany aktywności i własności molekularne błony. Wzrost polaryzacji fluorescencji opisującej uporządkowanie np. sondy DPH związanej lipidami błonowymi sygnalizuje spadek płynności błony czy spadek rotacyjnej swobody cząsteczki w trakcie agregacji [30, 67, 73, 78, 147].

W drugiej metodzie sond spinowych wykorzystuje się spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Wprowadzenie znaczników do błony pozwala na otrzymanie informacji o najbliższym otoczeniu cząsteczek, które po wbudowaniu zachowują się w przybliżeniu jak naturalne komponenty, posiadając ograniczoną swobodę ruchu, a tym samym dostarczają wiedzy o własnościach strukturalnych i dynamicznych błony. Jest ona uzyskiwana na podstawie analizy zmian kształtu linii widmowej i wyznaczanych parametrów odzwierciedlających mikrośrodowisko danej sondy takie jak płynność (mikrolepkość) czy stopień uporządkowania.

Znacznik lokuje się przede wszystkim w błonie plazmatycznej, czego dowodzą przeprowadzane w ciągu kilku minut od dodania znacznika pomiary i występowanie szybkiej destrukcji komórek. Podział puli cząsteczek znacznika między błonę a połączony z błoną system kanalików otwartych (OSC) dokonuje się w ciągu kilku sekund dzięki szybkiemu ruchowi translacyjnemu (o współczynniku dyfuzji  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s). Z drugiej strony jest mało prawdopodobne, by wewnątrzkomórkowe błony organelli były znakowane dzięki dyfuzji lateralnej sondy z błony plazmatycznej. Obszar organelli (składający się z ziarnistości, ciałek gęstych, mitochondriów i elementów gęstego układu kanalików) jest fizycznie oddzielony od błony powierzchniowej oraz OSC i aby doszło do ich znakowania, sonda musiałaby na zasadzie mechanizmu Flip-Flop przenieść się z zewnętrznej na wewnętrzną część błony (dla porównania dyfuzja poprzeczna w erytrocytach jest nieistotna), a następnie dyfundować w cytozolu do obszaru organelli. Zaobserwowany rozkład sygnału sondy w czasie i jego odwrócenie przez żelazicyjanek oraz odpowiedź w postaci spadku płynności błony po dodaniu jonów lantanu, które nie penetrują do wnętrza komórki, zdają się potwierdzać umiejscowienie znacznika. Lokowanie się sondy w błonie plazmatycznej i OSC nienaruszonych płytek mogą poświadczać eksperymenty ze znakowaniem wyizolowanych błon plazmatycznych, w których otrzymano porównywalne wartości parametrów, jak i zmiany w odpowiedzi na jony wapnia czy lantanu.

Sondy spinowe w błonie wykonują szybki anizotropowy ruch wokół długiej osi cząsteczki, co wskazuje, że znajdują się raczej w płynnych lipidach niż w powłoce błonowej, gdyż elastyczność grupy węglowodorowej jest większa blisko metylowego końca sondy [98].

#### **2.4. Hemodializa jako przykład zabiegu krążenia pozaustrojowego**

Nerki są narządami odpowiedzialnymi za regulację zawartości wody, elektrolitów i produktów przemiany białek w organizmie, a także pełnią funkcję hormonalną. W przypadku upośledzenia funkcji nerek, szczególnie w krańcowej niewydolności nerek rozwijającej się w efekcie przewlekłych chorób nerek, konieczne jest stosowanie wspomagającej terapii medycznej, która uchroni przed rozwojem mocznicy i zwiększy szanse na przeżycie pacjenta. Do metod leczenia nerkozastępczego należą: hemodializa, dializa otrzewnowa i przeszczepienie nerek. Najlepszą jakość i długość życia oferuje pomyślna transplantacja nerki, jednak z powodu niewystarczającej liczby dawców narządów dostępność tej metody jest mocno ograniczona. W Polsce i na świecie dominuje leczenie za pomocą hemodializy.

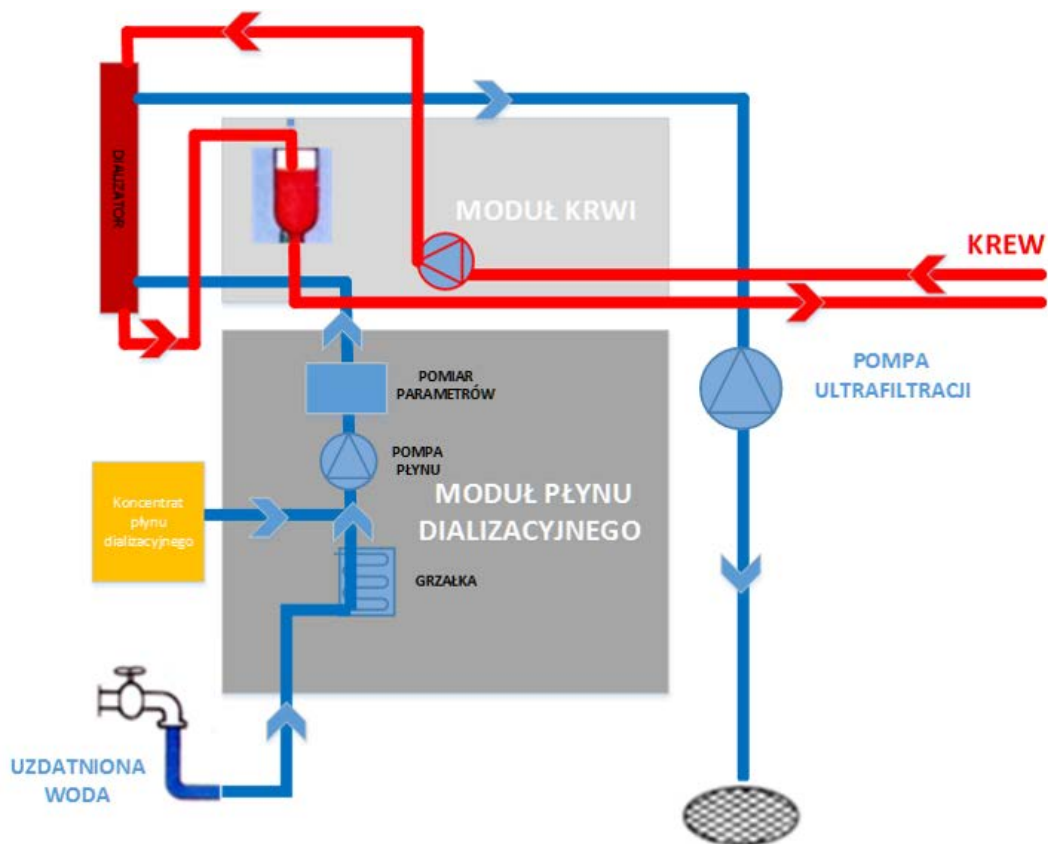
Hemodializa jest techniką mającą na celu oczyszczanie krwi z produktów przemiany materii o wielkości małych i średnich cząsteczek. Stosowana jest w ostrej czy przewlekłej niewydolności nerek, a także w przypadku zatrucia. Metoda ta opiera się na wymianie substancji między krwią a płynem dializacyjnym za pomocą błon półprzepuszczalnych, wykorzystując zjawiska fizyczne: dyfuzję, ultrafiltrację, osmozę i konwekcję.

Dyfuzja to zjawisko fizyczne polegające na transporcie cząsteczek rozpuszczonych w roztworze pod wpływem gradientu stężeń substancji rozpuszczonych. Ten samorzutny ruch cieplny cząstek w hemodializie odbywa się przez błonę półprzepuszczalną, a jego szybkość zależna jest od masy cząsteczkowej substancji rozpuszczonej czy oporności błony półprzepuszczalnej.

W ultrafiltracji ruch cząsteczek wody przez błonę jest wywołany przez ciśnienie hydrostatyczne lub osmotyczne, a towarzyszy mu transport cząsteczek rozpuszczonych w wodzie osocza krwi (konwekcja). O efektywności ultrafiltracji decyduje wielkość ciśnienia przebłonowego wynikającego z różnicy ciśnień między krwią i płynem dializacyjnym, współczynnik ultrafiltracji  $K_{uf}$  określającego właściwości błony dializacyjnej.

Najistotniejszym elementem układu do hemodializy jest dializator (Rys. 2), w którym dochodzi do usuwania z krwi produktów przemiany materii. Dzięki półprzepuszczalnej błonie następuje wymiana substancji między krwią i dializatem. Konstrukcja dializatora ma służyć osiągnięciu największego stosunku powierzchni błony do objętości krwi potrzebnej do jego wypełnienia. Obecnie największą powierzchnię kontaktu uzyskuje się w dializatorach

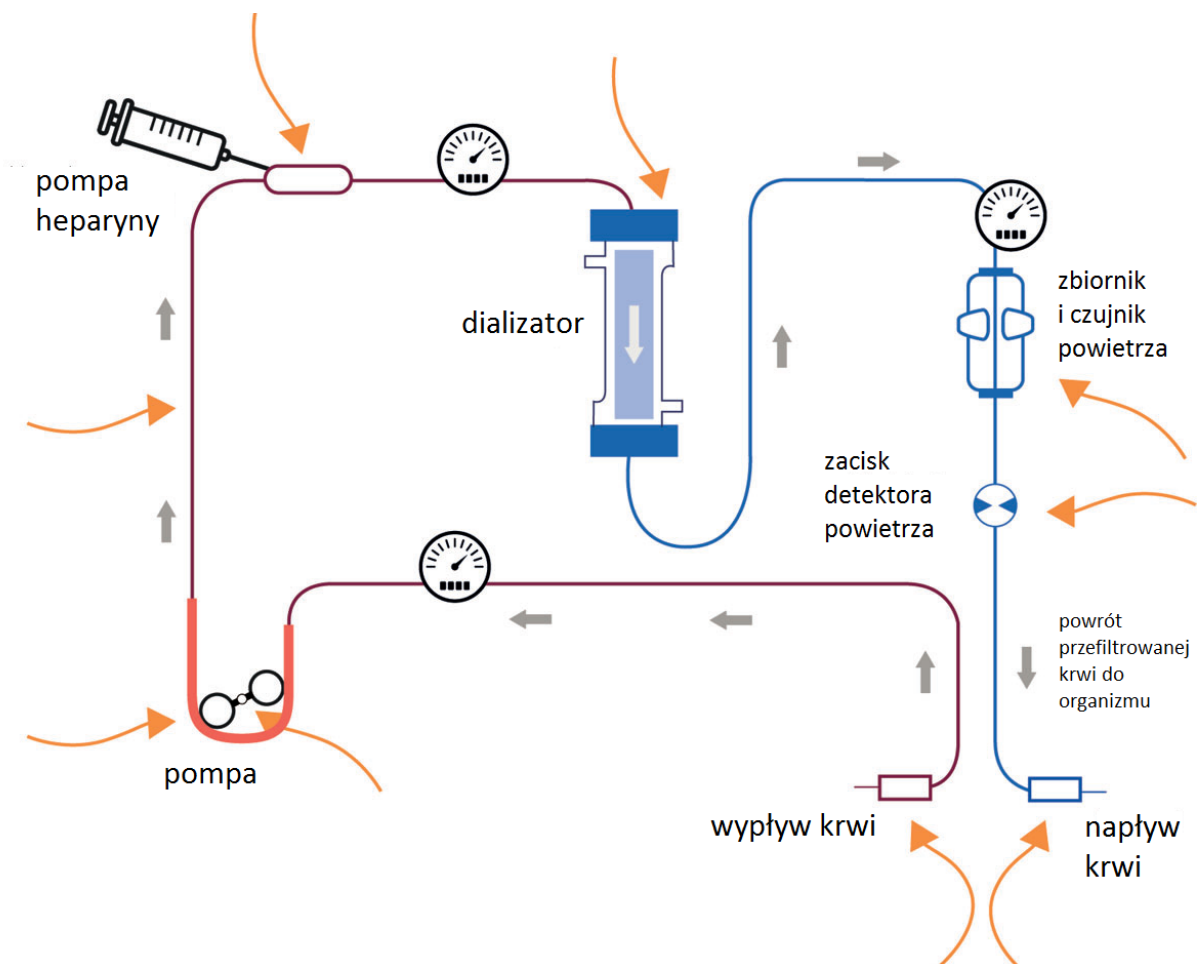
kapilarnych, w których błona dializacyjna w postaci tysięcy bardzo cienkich kapilar, przez które przepływa krew, zamknięta jest w cylindrycznej obudowie. Przez walec ten przepływa płyn dializacyjny, omywający z zewnątrz kapilary wypełnione krwią. Parametrami charakteryzującymi właściwości dializatora są powierzchnia wymiany, objętość wypełnienia, maksymalne dopuszczalne ciśnienie przez błonowe, współczynnik oczyszczania (klirens) cząsteczek, współczynnik ultrafiltracji, biogodność. Ze względu na rodzaje materiałów stosowanych do produkcji błon dializacyjnych dializatory można podzielić na celulozowe, ze zmodyfikowanej celulozy, półsyntetyczne i syntetyczne.



Rys. 2. Działanie aparatu do hemodializy. Obiegi: czerwony - krwi; niebieski - płynu dializacyjnego.

Błony celulozowe są silnie hydrofilowe, dzięki czemu sprzyjają adsorpcji białek na powierzchni błony. Charakteryzują się wysokim współczynnikiem oczyszczania dla małocząsteczkowych substancji, ale znacznie niższym dla średnich cząsteczek, a ponadto niską biogodnością. Ich zaletą jest jednak niska cena. W odróżnieniu od błon celulozowych błony zbudowane ze zmodyfikowanej celulozy, takie jak octan czy trójoctan celulozy, cechują się wyższą biogodnością. Błony półsyntetyczne, celulozowo-syntetyczne, wykazują wyższą biogodność i współczynnik ultrafiltracji przy podobnym klirensie cząstek.

Przewlekła choroba nerek jest stanem, w którym obserwuje się zaburzenia związane z funkcjonowaniem układu krążenia w postaci aktywacji płytek, ich degranulacji, integralności śródbłonna czy aktywacji wewnętrznego szlaku krzepnięcia [100]. Przewlekłej niewydolności nerek towarzyszy metaboliczna kwasowość prowadząca do zwiększonego katabolizmu białek, zmniejszonej syntezy białek i nierównowagi białkowej. W schyłkowej niewydolności nerek występują zaburzenia hemostaticzne, tendencje krwawienia związane są z dysfunkcjami płytek takimi jak defekty w agregacji, zmniejszonej adhezji i zawartości PF3, przyczyniającymi się do wydłużonego krwawienia. Osoczowe metabolity takie jak mocznik, kwas fenolowy hamują płytki, powodują anormalny metabolizm płytkowego kwasu arachidonowego [77].



Rys. 3. Układ do hemodializy i wskazanie (pomarańczowe strzałki) licznych boddźców mających wpływ na niekompatybilność stosowanej terapii [12].

Hemodializa jako terapia podtrzymująca życie mimo osiągnięć technologicznych nie jest techniką pobawioną wad i konsekwencji wynikających z krążenia pozaustrojowego. Powtarzający się kontakt przepływającej krwi z różnymi obcymi powierzchniami, powietrzem i geometrycznymi przewodami (liniami krwi, pompą rolkową) leżą u podłoża bioniekompatybilności biologicznej, fizycznej i chemicznej, które mogą doprowadzić do

modulacji odpowiedzi śródbłonna, zaburzając hemostazę lub aktywując biochemiczne szlaki, w następstwie których dochodzi do uszkodzeń komórek, szczególnie płytek, procesów zapalnych czy stresu oksydacyjnego (Rys. 3). Skutki kliniczne oddziaływania krwi ze sztucznymi powierzchniami zależą nie tylko od rodzaju materiału membran zastosowanego w dializatorze [12, 101]. Szlaki aktywacji białek osoczowych i komórek zapoczątkowane są także w momencie kontaktu krwi z powietrzem i mogą prowadzić do koagulacji czy denaturacji. Rodzaj i intensywność odpowiedzi biologicznej na niekompatybilne materiały zależą od reologii krwi, która jest modyfikowana przez geometrię urządzenia i warunki przepływu nie tylko w dializatorze, ale w całym układzie [12].

#### **2.4.1. Oddziaływanie z błoną dializatora**

Już od pierwszego momentu kontaktu krwi z obcą powierzchnią białka osocza zostają zaadsorbowane, co determinuje zachodzące kolejno reakcje i szlaki biochemiczne. Zjawisko adsorpcji białek jest złożone i zależne od fizykochemicznych właściwości powierzchni (chropowatość, grubość, porowatość, skład, hydrofobowość, ładunek), w które zaangażowane są oddziaływania hydrofobowe, elektrostatyczne, wodorowe i van der Waalsa. Jednocześnie z adsorpcją białek dochodzi do adhezji części płytek. Adsorpcja białek stanowiąca wstęp do aktywacji krzepnięcia, układu dopełniacza i komórkowego, jest procesem dynamicznym postępującym w czasie prowadzenia hemodializy. Dla różnych błon wzór adsorbowanych białek jest inny i zależny do własności chemicznych powierzchni (wolnych grup chemicznych), ładunku i napięcia powierzchniowego czy lepkości. Adsorpcja białek przejawia się jako proces zmienny i konkurencyjny w postaci ciągłej adsorpcji i desorpcji, a redystrybucja zależy także od przepływu krwi i sił ścinających występujących w trakcie hemodializy. Bardziej hydrofobowe membrany wykazują zmniejszoną adsorpcję białek, a inne takie jak polimetakrylan metylowy - zwiększoną. Warstwa zaadsorbowanych białek może tworzyć się nie tylko na powierzchni, ale także w porach (zatykanie kapilar dializatora), zwężając je i redukując transport, obniżyć efektywność HD [12, 101].

#### **2.4.2. Aktywacja koagulacji i płytek**

Zachodząca adsorpcja białek jest fundamentalna do zapoczątkowania wewnątrzpochoдного (aktywowanego kontaktem) szlaku krzepnięcia. Wiązanie czynnika XII, prekalikreiny i wielkocząsteczkowego kininogenu do ujemnie naładowanych powierzchni (np. szkła) inicjuje kaskadę aktywującą czynnik X i II prowadzącą do tworzenia trombiny przekształcającej fibrynogen do nierozpuszczalnej fibryny tworzącej skrzep [12, 77, 101].

Adhezja płytek stanowi wczesny etap ich aktywacji. Zaadsorbowany fibrynogen czy inne białka adhezyjne pobudzają adhezję płytek poprzez wiązania z receptorami glikoproteinowymi na powierzchni płytek, a kinetyka tych zjawisk zależy od konformacji i liczności białek na powierzchni [12]. Adhezji płytek na sztucznych powierzchniach towarzyszy uwalnianie płytkowych czynników wzrostu, serotoniny, PF4 czy  $\beta$ -TG, a także ekspresji na powierzchni błony p-selektyny (CD62p), co ma miejsce już w ciągu pięciu minut trwania HD [77, 101].

U pacjentów hemodializowanych prokoagulacyjne działania płytek są wzmacniane poprzez aktywację dopełniacza wywołaną membraną dializatora, powodującą w efekcie tworzenie kompleksów płytkowo-neutrofilowych.

Aktywacja płytek następuje nie tylko w wyniku kontaktu z dializatorem, ale pojawia się także na skutek użycia igły do wkłucia, kontaktu krwi z powietrzem, działania pompy rolkowej, górnej części dializatora w miejscu wpływu krwi jak i komory powietrznej powodującej denaturację białek [12]. Składniki krwi przepływając przez pompę rolkową mogą na skutek mechanicznej kompresji ulec uszkodzeniu prowadzącemu do hemolizy, której towarzyszy uwalnianie ADP powodujące płytkową agregację [12, 101]. Niefizjologiczne warunki, w jakich dochodzi do ultrafiltracji, powodują natychmiastowe osadzanie warstwy białek, które mogą prowadzić do aktywacji koagulacji. Kontakt wyczerpanych płytek ze sztuczną powierzchnią membran skutkuje ekspresją p-selektyny i uwalnianiem ziarnistości, natomiast aktywowane siłami ścinającymi mają tendencję do agregacji [101].

Konsekwencją zastosowania hemodializy w terapii nerkozastępczej jest aktywacja układu dopełniacza, która może nastąpić w sposób pośredni lub bezpośredni. Mechanizmy pośredniej aktywacji to:

- Wiązanie immunoglobuliny G do biomateriału inicjujące klasyczny szlak;
- Lektynowy szlak aktywowany przez węglowodany lub acetylowane związki;
- Aktywacja alternatywnego szlaku przez zmodyfikowane powierzchnie biomateriałów pokrytych białkami. Bezpośrednia aktywacja następuje poprzez wiązanie materii dopełniacza z powierzchnią, co skutkuje rozszczepieniem białka C3 do formy C3a i C3b, produkcją konwertazy C5, która rozszczepia białko C5 na C5a i C5b, wiązaniem leukocytów z fragmentami białka C3 prowadzące do leukopenii. Procesy wywołanej kontaktem aktywacji dopełniacza są wzmacniane przez rekrutację i aktywację leukocytów prowadzące do fali oksydacyjnej oraz uwalniania prozapalnych cytokin i chemokin. Ponadto aktywowane przez białko C5a neutrofile uwalniają enzymy o właściwościach silnie prooksydacyjnych i prozapalnych [12].

Zwiększona trombogenność wynikająca z prowadzenia hemodializ i związana ze zmniejszonym przepływem krwi, zmianami w ścianach naczyń krwionośnych, składzie krwi i biokompatybilnością, powoduje zmniejszenie efektywności HD [101].

Płytki o większej objętości są bardziej aktywne, a zatem mierzony parametr objętościowy (ang. *mean platelet volume*, MPV) świadczy o stymulacji płytek lub tempie ich produkcji. Jego wartość jest wyższa podczas aktywacji lub przy zwiększonej liczbie dużych hiperagregowalnych płytek, co stanowi czynnik ryzyka sercowego. Duże bardziej reaktywne płytki produkują więcej czynników prozakrzepowych i łatwiej agregują, posiadają więcej ziarnistości gęstych i uwalniają więcej serotoniny i  $\beta$ -tromboglobuliny [38, 77].

Następująca aktywacja wraz z przeprowadzaniem kolejnych dializ prowadzi do zubożenia ziarnistości płytek, zmniejszenia ich objętości i skrócenia czasu życia. U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek leczonych hemodializami obserwuje się niższą frakcję niedojrzałych i mniejszą liczbę wszystkich płytek, która postępuje od rozpoczęcia terapii. Jednak uwalnianie puli płytek z magazynów w trakcie HD powoduje heterogenny rozkład populacji płytek [100, 101].

## **2.5. Wpływ promieniowania o malej mocy na płytki krwi**

### **2.5.1. Promieniowanie z zakresu spektralnego czerwonego**

Korzystny wpływ promieniowania laserowego niskiej mocy wykorzystywany jest w leczeniu wielu chorób także związanych ze zmianami w hemostazie i własnościach reologicznych: niedokrwienna choroba serca i zakrzepica żył siatkówki, zawał mięśnia sercowego, leczenie złamań.

W lecznictwie stosowane były różne źródła promieniowania, początkowo to głównie lasery, a w miarę rozwoju techniki diody laserowe i standardowe źródła światła. Jak wynika z literatury nie ma znaczenie źródło światła, a istotna jest częstotliwość i dawka promieniowania [6, 31, 68, 94, 128, 150, 151]. W pracy [152] wyraźnie podkreślono, że wybór źródła światła jest nieistotny.

W eksperymentach *in vitro* pokazano wzrost adhezji komórek HeLa do komórek i komórek na szkle, ochronę erytrocytów przed uszkodzeniami wywołanymi aparatem sercowo-płucnym, zwiększoną regenerację po niedokrwienym uszkodzeniu komórek hipokampa, oddziaływanie z cyklem komórkowym i różne działania na proliferację komórki oraz zmianę w aktywności fagocytowej, żywotności, adhezji i poziomie procesów metabolicznych komórek wielojądrzastych i monocytów. Doniesienie opisujące efekty promieniowania laserowego przedstawiają poprawę liczności komórek krwi i temperatury



ciała, stymulację komórek krwi, poprawę mikrocyrkulacji, detoksyfikację itd. Promieniowanie laserowe małej intensywności poprawia parametry reologiczne krwi (powstrzymanie zjawiska osadu) i wywołuje syndrom hipokoagulacyjny, co zwiększa organiczny przepływ krwi szczególnie w przypadku arteriosklerotycznych uszkodzeń naczyń (działanie antyniedokrwienne), laser o  $\lambda = 633$  nm deformuje erythrocyty, zmienia współczynnik dyfuzji i wpływa na agregację płytek [31, 58, 151].

Wpływa na układ krzepnięcia i fibrynolizę (wpływ antykoagulacyjny i fibrynolityczny) zmniejszając krzepliwość i hamując tworzenie skrzepów, co jest tłumaczone przez blokowanie aktywacji tromboplastyny i opóźnienie konwersji protrombina-trombina bez znaczącego wpływu na fibrynogenezę, choć nie wszystkie badania to potwierdzają.

Mechanizmy molekularne zmian struktury i funkcji wywołane laserem są niejasne i zależne od rodzajów komórek, warunków naświetlania i zastosowanej energii, efekty nieliniowe zależą też od długości fali i dawki [18, 58, 84, 114, 115, 117, 151].

Przynajmniej cztery mechanizmy mogą być zaangażowane w pierwotną odpowiedź na promieniowanie laserowe [117]:

- niespecyficzne zmiany strukturalne płynów biologicznych,
- fotochemiczna aktywacja reakcji wolnorodnikowych (szczególnie peroksydacja lipidów),
- bezpośredni wpływ membranotropowy z modyfikacją dwuwarstwy lipidowej,
- konformacyjne reorganizacje w białkach z współistniejącą modulacją reakcji zależnych od receptora (receptorowych) i metabolicznych.

Płytki jako komórki bezjądrzaste są atrakcyjnym układem modelowym do badań pewnych aspektów działania lasera na komórkę. Jako niezwykle wrażliwe na działania bodźców szybko się aktywują, więc jako model do badań mechanizmów komórkowych działania fotonów o niskiej energii są łatwo akceptowalne, odpowiadające zmianą funkcji po naświetlaniu i dysfunkcje precyzyjnie mierzalne, a dodatkowo związane z wymienionymi efektami hemostatycznymi i reologicznymi [18, 84].

Badanie działania naświetlania laserem niskiej mocy na procesy wydzielnicze przeprowadzono na krwi świńskiej poddanej ekspozycji na promieniowanie (5 mW, 670 nm, 25 °C, dawki energii 1-5 J) i dokonano pomiaru uwalnianych białek i nukleotydów adeninowych, produkcji substancji reagujących na kwas tiobarbiturowy (TBARS) reprezentujących metabolity endogenne arachidonianu i generacji anionu ponadtlenkowego. Na tej podstawie określono, że naświetlanie wywołało:

- zależną od dawki produkcję TBARS (największy dla 1,8-2 J) – wzrost być może nie tylko z powodu wywołanej naświetlaniem nieenzymatycznej peroksydacji lipidów, lecz także w wyniku enzymatycznej stymulacji arachidonianu płytkowego i produkcji tromboksanu  $A_2$  ( $TxA_2$ ) i dialdehydu malonowego (MDA);
- uwalnianie rodnika ponadlenkowego z płytek zależnie od dawki (największe dla 1,8-2 J) – ma miejsce w aktywowanych płytkach i jest związane z metabolizmem arachidonianu, co sugeruje stymulację kaskady arachidonianu pod wpływem naświetlania;
- uwalnianie nukleotydów i białek (największe dla 2 J);
- naświetlonych płytkach obecne procesy sekrecji, nawet największa dawka nie powoduje wydostawania się z płytek enzymu cytozolu dehydrogenazy mleczanowej (LDH).

Określenie TBARS w aktywowanych płytkach odzwierciedlający poziom MDA jest pośrednią metodą przybliżania wielkości tromboksanu  $A_2$ , które są razem z MDA w stymulowanych płytkach w tych samych ilościach, a MDA jako produkt cyklooksygenazy jest markerem metabolizmu arachidonianu. Wzrost poziomów TBARS po naświetlaniu może reprezentować ilość MDA produkowanego w kaskadzie arachidonianu w szlaku cyklooksygenaz, koresponduje z generacją anionu ponadtlenkowego i uwalnianiem nukleotydów adeninowych oraz białek (maksimum przy tych samych dawkach).

Obserwowane efekty sugerują, że promieniowanie czerwone podobnie jak UV jest czynnikiem fizycznym odpowiedzialnym za aktywację płytek, czyli procesy sekrecji i szlak arachidonianu. Podczas aktywacji przez różnych agonistów płytki wykazują cztery podstawowe zjawiska: adhezję, zmianę kształtu, sekrecję i agregację. Większość agonistów (trombina, kolagen,  $TxA_2$ , PAF – płytkowy czynnik aktywujący) pobudza poprzez wiązanie z receptorami powierzchniowymi wywołując kaskadę wewnątrzkomórkowych przekaźników drugorzędowych przez różne G-proteiny. Ważnym drugorzędowym przekaźnikiem aktywacji wywołanej agonistą są wewnątrzkomórkowe wolne jony wapnia.

Inne doniesienia wskazują na stymulację czerwonego lasera poprzez powiększenie sieci cytoszkieletu i podniesienie poziomu wolnych jonów wapnia w cytoplazmie. Błona i szkielet cytoplazmatyczny płytek przebudowywane są podczas aktywacji częściowo za pośrednictwem szlaków sygnałowych. Dodatkowo błona dostarcza fosfolipidom substancji do produkcji kwasu

arachidonowego, prekursora eikozanoidów jak i innych półproduktów zaangażowanych w aktywację [84].

Współczesna koncepcja biofizyczna mówi o terapeutycznym wpływie promieniowania laserowego realizowanym nie przez specyficzny mechanizm receptorowy i płyny biologiczne, ale wiąże się z szerokim spektrum działań na biopolimery: proteiny, lipoproteiny i strukturalne składniki błon biologicznych, co może być odpowiedzialne za wszechstronne antyagregacyjne działanie promieniowania laserowego He-Ne (630 nm, 1 mW) podobnie *in vitro* i *in vivo* hamując agregację wywołaną ADP, epinefryną, kolagenem, PAF i fibrynogenem [117]. Promieniowanie o długości fali 660 nm powodowało inhibicję agregacji płytek najsilniejszą dla pojedynczej dawki 0,045 J/cm<sup>2</sup> i wzrastającą ze wzrostem dawki. Po naświetleniu i użyciu disulfiramu (inhibitor dysmutazy ponadtlenkowej) agregacja została najbardziej zahamowana [35, 58].

W badaniach tłumienia funkcji płytek poddanych naświetlaniu laserem 630 nm o mocy 1 mW *in vitro* i *In vivo* promieniowanie wywołało dwukrotną redukcję agregacji spontanicznej i agregacji w odpowiedzi na agonistów (bardziej dla kolagenu, PAF i fibrynogeny niż ADP, adrenaliny i ristocetyny). Prawdopodobny jest wpływ na odbudowę błony i zmiany czułości receptorów, której obniżenie może wynikać ze szkodliwego wpływu promieniowania na mechanizm aktywacji, a zwłaszcza modyfikacji błonowych receptorów glikoproteinowych.

Dodanie do płytek kontrolnych płytek z dodatkiem wywołującego produkcję TxA<sub>2</sub> kolagenu zwiększyło agregację (uwolniony TxA<sub>2</sub>), a w naświetlanych obserwowany czterokrotny spadek agregacji wynikający być może z powodu redukcji czułości na TxA<sub>2</sub>, czyli uszkodzenia płytek. Zastosowanie aspiryny (inhibitor COx) i imidazolu (inhibitor STx) spowodowało prawie całkowitą inhibicję agregacji płytek naświetlanych – przypuszczalnie kluczowe enzymy kaskady kwasu arachidonowego (cyklooksigenaza i syntetaza tromboksanu, COx i STx) odgrywają ważną rolę w uszkodzeniach aktywności wskutek naświetlania. Naświetlanie tłumy 10-krotnie uwalnianie z aktywowanych kolagenem płytek biologicznie aktywnych substancji skutkujących agregacją (druga fala agregacji np. po adrenalinie) i w ten sposób redukuje aktywność receptorów. Dodanie TxA<sub>2</sub>, gdy zablokowane są enzymy kaskady kwasu arachidonowego i zahamowana agregacja indukowana kolagenem, przywraca funkcje płytek, jednak nie po naświetlaniu [115].

Inne doniesienia opisują, że ekspozycja PRP na promieniowanie laserowe (3,5 W) przez 30 s obniża progowe stężenie ADP i L-epinefryny potrzebnej do całkowitej agregacji płytek, zwiększa podstawowy poziom tromboksanu A<sub>2</sub>, płytki filtrowane żelowo poddane działaniu lasera nie wykazały wpływu na tworzenie prostanoidu, chociaż dodanie naświetlonego PRP

stymulowało syntezę trombosanu  $A_2$  w tych komórkach. Wpływ lasera całkowicie zablokowany poprzez dodanie dysmutazy ponadtlenkowej lub katalazy do PRP wskazywał, że stymulacja syntezy trombosanu  $A_2$  odbywa się za pośrednictwem generowania rodników ponadtlenkowych. Badania mikroskopii elektronowej wykazywały laserową stymulację syntezy trombosanu  $A_2$  w płytkach bez widocznego zniszczenia struktur komórkowych [8].

W następstwie naświetlania wzrasta się dezagregacja w osoczu z użyciem kolagenu i epinefryny oraz pojawia się po zastosowaniu ADP jako agonisty – zmniejszenie aktywacji płytek po naświetlaniu prawdopodobnie wynika z zaburzenia procesów w układzie krzepnięcia wspólnych dla wszystkich receptorów tych aktywatorów, co może być uwalnianiem wapnia lub syntezą cAMP w płytkach. Odwracalność agregacji ma biologiczne znaczenie, regulowane przez równowagę między układami prostacykliny i prostaglandyny, a zależy od intensywności i czasu stymulacji, która, jeśli jest dostatecznie silna i długa, prowadzi do uwalniania z układu gęstych kanalików odpowiednich ilościach wapni aktywujący fosfolipazę i pobudza wydzielanie trombosanu  $A_2$ . To sugeruje, że naświetlane płytki nie wydzielają wystarczających ilości drugorzędowych aktywatorów agregacji w odpowiedzi na aktywatorów, co prowadzi do dezagregacji, ale nie można wykluczyć, że następująca trombocytopenia warunkuje obniżenie czułości płytek na aktywatorów.

Naświetlanie krwi zdrowych dawców wywołało zespół hipokoagulacji, być może wpływając zarówno na układ krzepnięcia jak i aktywność funkcjonalną płytek. Przy nieobecności płytek naświetlanie nie wpłynęło na układ krzepnięcia krwi, ale naświetlanie osocza może potencjalnie hamować uwalnianie czynników płytkowych wywołujących mechanizmy krzepnięcia. Przymuszalnie promieniowanie działa na układ krzepnięcia pełnej krwi poprzez płytki, bo tylko w ich obecności obserwowana jest hipokoagulacja. Promieniowanie wpływa zatem na układ krzepnięcia krwi poprzez płytki bezpośrednio wykazujące zmiany w odpowiedzi na agonistów oraz prawdopodobnie poprzez tłumienie wydzielania czynników płytkowych i aktywności protrombinazy jak i opóźnianie tworzenia skrzepu fibrynowego [114].

Oprócz obniżania agregacji promieniowanie laserowe może ją wzmocnić w przypadku zaburzenia funkcji agregacyjnej (hipoagregacja), poprawiając dysfunkcje trombocytów [23].

Agregacja spontaniczna była efektywnie stabilizowana przez naświetlanie lub dochodziło do jej spadku. Nie obserwowano zmian w całkowitej liczbie płytek, ale następowała redystrybucja populacji – następuje redukcja form aktywowanych (sferycznych) i wzrost w populacji dyskoidalnych (nieaktywnych), co wskazuje na stabilizujący wpływ promieniowanie poprzez zmniejszanie liczby aktywowanych i ich zdolności do aktywacji,

prawdopodobnie nie działając bezpośrednio na receptory. Antyagregacyjny wpływ może być związany z niespecyficznym efektem membranotropowym, co jest tłumaczone zgodnością z wynikami kwaśnej hemolizy erytrocytów bardziej tolerancyjnych na kwaśne środowisko [115, 117]. Istnieją także doniesienia o spadku liczby (o 5.26%) oraz średniej objętości płytek MPV (o 33.3%) po naświetlaniu laserem He-Ne o parametrach: 632,8 nm, 1 mW, intensywność 0,08 W/sr, średnia gęstość mocy działającej na próbkę ok. 30 mW/cm<sup>2</sup> czy 633 nm, 1,1 mW, ekspozycji 20-30 minut [109, 148].

Wyniki wskazują na antyoksydacyjne działanie promieniowania, inhibicja peroksydacji zmniejsza zawartość nienasyconych lipidów, co zwiększa sztywność błony, więc obserwowane zmiany mikrolepkości związane są z działaniem membranotropowym. Zaproponowany został schemat działania: absorpcja kwantu promieniowania przez molekuly protein → wzrost energii w proteinie z towarzyszącym lokalnym grzaniem i reorganizacjami struktury → spadek mikrolepkości dwuwarstwy lipidowej i tendencja do spadku mikrolepkości w regionach kontaktowych lipidów i białek → zmiany konformacyjne w receptorach błonowych i przesunięcia/zmiany potencjałów błonowych widocznych jako spadek funkcjonalnej aktywności płytek → działanie fizjologiczne ujawnione jako tłumienie agregacji → poprawa mikrocyrkulacji krwi [117]. Niespecyficznym membranotropowym działaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego tłumaczono zmniejszanie agregacji płytek (w aktywności funkcjonalnej płytek zmniejszona czułość na TxA<sub>2</sub>) [116].

W porównaniu naświetlania laserem He-Ne i alternatywnym źródłem światła LED 660 nm hamujący wpływ na szybkość pierwotnej agregacji, rozmiar agregatów, szybkość i amplitudę wtórnej agregacji był silniejszy dla lasera. Inne pomiary wykazywały, że pozaustrojowe i wewnątrznaczyniowe naświetlanie skutkowało niestabilnością agregatów i ich łatwym rozpadaniem, brakiem zmian liczby krążących płytek po reinfuzji naświetlanej krwi, a stopień inhibicji był niezależny od metody i źródła naświetlania, ale różny u pacjentów i różny w trakcie terapii, a bez zmian u pacjentów z zablokowanymi funkcjami płytek. Pomimo mniejszych objętości naświetlanych pozaustrojowo mierzone skutki hamujące były podobne, dobrze widoczne w pełnej krwi, ale nieznaczące przy bezpośrednim naświetlaniu w trakcie normalnej szybkości przepływu [46].

Dodatkowo znaczenie może mieć typu polaryzacji promieniowania. Badanie wpływu różnych polaryzacji światła laserowego na płytki półprzewodnikowym laser (660 nm, 16,5 J) o polaryzacji liniowej oraz kołowej prawo- i lewoskrętnej na adhezję i agregację na powierzchni polistyrenowej przy szybkości ścinania 1800 s<sup>-1</sup> wykazało dla lewoskrętnej polaryzacji kołowej wzrost pokrycia powierzchni (SC) i spadek liczba przywartych obiektów,

dla prawoskrętnej polaryzacji brak zmian średniego rozmiaru (AS) przywarzonych płytek i ich agregatów, ale obniżenie ich ilości, a liniowo spolaryzowane światło ma ten sam wpływ obniżający liczbę osadzanych płytek, jednak SC jak i AS nie zmieniło się. Wyniki wykazują wpływ czerwonego lasera na agregację na polistyrenie przy dużej szybkości przepływu zależne od polaryzacji [15].

W poszukiwaniach pierwotnego akceptora energii lasera odpowiedzialnego za modulację aktywności płytek miało pomóc badanie wpływu promieniowania lasera He-Ne (632,8 nm, 7 mW, dawki 0,42-4,2 J zależne od czasu 1-10 min) na funkcje płytek w przepływie z prędkością ścinania  $1300 \text{ s}^{-1}$  i stan procesów błonowych oddających aktywację płytek. Wcześniej wykazano zmniejszone osadzanie płytek na podśródbłonkowej pozakomórkowej macierzy (ECM) w warunkach oscylacyjnych po naświetlaniu.

Badania pokazały, że naświetlanie ( $> 2 \text{ min.}$ ) spowodowało obniżenie agregacji wywołaną TRAP (ang. *thrombin receptor activating peptide*) lub PMA i hamowanie osadzania na ECM w przepływie zależnie od dawki i odwracalnie w czasie 30-60 min. po naświetlaniu. Spadek adhezji i agregacji po naświetlaniu może być rezultatem prawdziwego inaktywacyjnego działania promieniowania i pierwotnej aktywacji następującej po zmęczeniu. Jednak w tym drugim przypadku liczba płytek powinna spadać ze względu na agregację, co nie miało miejsca w eksperymencie i świadczy o nieobecności hyperagregacji.

Analiza funkcjonalnej aktywacji płytek związana z konformacyjną reorganizacją receptora GPIIb-IIIa umożliwiającą wiązanie fibrynogenu oraz ekspresję składników ziarnistości  $\alpha$  głównie P-selektyny wskazała na nieobecność spontanicznej aktywacji w kontrolnych próbkach i brak zmian po naświetlaniu oraz hamujące działanie promieniowania na wiązanie fibrynogenu i ekspresję P-selektyny na błonie plazmatycznej tylko w niższych stężeniach TRAP odzyskane po 30 minutach [18, 14, 17]. Pierwotny akceptor energii laserowej odpowiedzialny za zmiany płytek zlokalizowany jest w płytkach, a nie innych komórkach czy osoczu, o czym świadczą wyniki wpływu promieniowania na poszczególne frakcje krwi: PRP i płytki otrzymane z filtracji żelowej wykazały spadek pokrycia powierzchni i średniego rozmiaru obiektu związanych z ECM (o mniejszej aktywności), a PPP, czerwone i białe krwinki nie ujawniły zmian. Receptory glikoproteinowe przypuszczalnie są niezdolne do absorpcji światła w zakresie czerwonym, bo nie zawierają klasycznych chromoforów – wcześniej wskazywano na dwa enzymy, cyklazę guanylanową i syntetazę tlenku azotu, bo posiadają hem, a NO-syntetaza dodatkowo nukleotydy flawinowe jako grupę prostetyczną, zdolne zaabsorbować światło w zakresie czerwonym widma. Aktywacja NO-syntetazy prowadzi do tworzenia NO i stymulacji cyklazy guanylanowej powodującej akumulację cGMP

w komórce. Zaobserwowany wzrost cGMP po naświetlaniu sugeruje działanie na płytki poprzez aktywację syntetazy cGMP, a nie poprzez inhibicję ich niszczenia. Wiadomo, że układ zależny od cGMP zaangażowany jest w regulację aktywacji, adhezji i agregacji, dlatego akumulacja cGMP może obniżać funkcje płytek. Brak dodatkowego hamującego działania na cGMP i cAMP płytek potwierdza udział cyklicznych zależnych od nukleotydów układów w działaniu promieniowania. Zwiększony poziom cGMP może prowadzić do podniesienia cAMP z powodu inhibicji niespecyficznych fosfodiesteraz, co wyjaśnia podobne wyniki uzyskane dla egzogenicznych cGMP i cAMP, więc układ cGMP jest głównym szlakiem wpływającym na funkcje płytek [18].

W celu sprawdzenia hipotezy molekularnej podstawy biologicznego działania promieniowania lasera He-Ne jako indukowanej światłem reorganizacji lipidów płytkowych i ich roli w biochemii adaptacji komórki do promieniowania laserowego niskiej intensywności płytki z krwi wołowej naświetlano laserem o mocy 2 mW przez 5 min dawką 6 J/cm<sup>2</sup>.

Hydrofobowe fragmenty lipidów decydujące o mikrolepkości i najbardziej wrażliwe na fotobiostymulację to długołańcuchowe nienasycone kwasy tłuszczowe 18:1, 18:2, 18:3, 20:1, 20:2, 20:4, 22:1 i nasycony kwas 22:0. Różne zmiany w składzie kwasu tłuszczowego 16:0, 18:1, 18:2, 20:1, 20:4, 22:0 i 22:1 w fosfolipidach i obojętnych lipidach wskazują na indukowaną światłem aktywację procesów wymiany leżących u podstawy relacji metabolicznych między różnymi klasami lipidów, szczególnie jest to obserwowane w kaskadzie fosfatydyloinozytolu posiadają charakterystyczny zestaw kwasów tłuszczowych. Modyfikacja składu lipidu po naświetlaniu skutkuje zmniejszeniem mikrolepkości, czemu towarzyszy 28% wzrost fluorescencji ekscimerów pyrenowej sondy hydrofobowej. Molekularna reorganizacja składu lipidowego uzasadnia fotoindukowaną reorganizację biomembran jako integralną odpowiedź biochemiczną struktur leżące u podstaw długoczasowej adaptacji. Naświetlanie płytek powoduje o 90% zwiększoną aktywność fosfolipazy A<sub>2</sub> (specyficzny dla fosfolipidów zawierających arachidonian), który katalizuje tworzenie kwasu arachidonowego i lizofosfatydylocholin biorących udział (łącznie z ich metabolitami) w regulacji funkcjonalnej aktywności płytek. Wysoki poziom fosfolipazy C manifestuje się we wzroście poziomu 1,2-diacylglicerolu o 45% i myo-inositol-1,4,5-trifosforanu o 120%, który jednak jest niewystarczający do maksymalnego uwalniania z magazynów wapnia, ponieważ jego zawartość w aktywowanych płytkach wzrasta wielokrotnie. W tym samym czasie dynamika poziomu 1,2-diacylglicerolu świadczy o jego wysokiej aktywności po naświetlaniu. Odkrycia te świadczą o aktywacji zależnego od lipidów układu kontroli komórki, która bierze udział w kontroli funkcji płytek [85].

Promieniowanie He-Ne można zatem scharakteryzować jako czynnik informujący, którego wpływ pośredniczony jest przez złożone reakcje błonowe: ilościowe i jakościowe reorganizacje fazy lipidowej błony, modyfikacje zależnego od lipidu układu kontroli komórki i tworzenie drugorzędowych przekaźników kluczowych w biochemicznych procesach adaptacji komórkowej [123].

### **2.5.2. Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR)**

Widma absorpcyjne i rozproszeniowe wielu tkanek ludzkich wykazują absorpcję promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni NIR. W przedziale fal o długości 800-1200 nm obserwowane są pasma elektronowe, nadtony i ich kombinacje. Hemoglobina wykazuje pasma absorpcyjne dla 760, 805, 820, 910, 1020 nm. Lipidy absorbują promieniowanie o długościach 770, 920, 1040 nm, białka: 910, 1020 nm, natomiast woda dla 749, 880, 980, 1211, 1450, 1787 nm, które stanowią nadtony wibracyjne bądź kombinację pasm [88]. Pasma w tym regionie są bardzo słabe, dlatego region ten charakteryzuje się wysoką transparentnością i zwane jest „oknem optycznym”, mającym zastosowanie biomedyczne. W obszarze NIR dominują pasma nadtonów grup funkcyjnych zawierających atom wodoru (takich jak OH, CH, NH) [88].

Jedynie zaabsorbowane promieniowanie może indukować reakcje fotochemiczne na skutek przejścia cząsteczki w stan wzbudzony. Dlatego w mechanizmie wyjaśniającym działanie światła na tkanki wskazuje się na chromofory absorbujące promieniowanie z zakresu NIR jako różne cząsteczki, które w stanie wzbudzenia inicjują w sposób fotochemiczny kaskady różnych reakcji [49, 48, 47].

Badania nad reakcjami fotochemicznymi wywołanymi wzbudzeniem wibracyjnym w obszarze promieniowania NIR pokazały, że wzbudzenie nadtonów i przejść w tym regionie dla wody prowadzi do tworzenia jonów  $H_3O^+$  i  $OH^-$  [57, 80, 79, 89, 134]. Najprostszym wyjaśnieniem pierwotnego działania promieniowania NIR jest zatem transfer protonu w wiązaniu wodorowym tworzącym parę jonową. Absorpcja promieniowania NIR może powodować zaburzenie energii wiązania wodorowego, co z kolei może prowadzić do jego zerwania i zwiększenia dysocjacji cząsteczek wody [80]. Biomolekuły posiadające silnie związaną wodę i wykazujące zmiany strukturalne pod wpływem promieniowania NIR: DNA [120], aminokwasy [86, 87] i błony [61, 63, 64] lub komórki [28, 60, 130, 133] mogły ulec modyfikacjom na skutek pośredniego działania promieniowania na reorganizację wody. Mechanizm działania promieniowania NIR jako wyniku jonizacji wody i zmiany struktury wiązań wodorowych dotyczy nie tylko materii biologicznej, ale ma charakter uniwersalny,



o czym świadczą efekty wywołane absorpcją światła o energiach odpowiadających nadtonom wibracyjnym grup NH, SH, OH, POH i CH [25, 64, 71, 89, 121, 134].

Obecność wody w tkankach jest powszechna, tworzy ona warstwy wokół pojedynczych jonów, polarnych i niepolarnych struktur, aminokwasów, białek i struktur komórkowych. Badania pokazały, że na skutek absorpcji energii z zakresu NIR warstwa wody ulega zmianom pod kątem koncentracji protonów w różnych jej częściach, co w efekcie manifestuje się obniżeniem pH warstwy wody najbliższej strukturze, podczas gdy już w odległości 1 mm stężenie jonów  $H^+$  jest 1000 razy większa [153]. Ze względu na zależność struktury trzeciorzędowej tkanek od pH, jego zmiana może powodować modyfikacje efektywności enzymów, receptorów, pomp jonowych czy kanałów jonowych, biorących udział w procesach regulujących komórki.

Przeprowadzone badania potwierdzają związek wody z fotochemicznym mechanizmem działania promieniowania NIR. Szerokość pasm absorpcyjnych w tym regionie promieniowania elektromagnetycznego stanowi przyczynę otrzymania zbliżonych efektów dla różnych długości fal. Reaktywność tworzących się jonów  $OH^-$  i  $H^+$  oraz zmian strukturalnych wiązań wodorowych na skutek działania promieniowania NIR jest zależna od rekombinacji tych jonów, a więc odległości między nimi. Efekt ten może stanowić uzasadnienie nieliniowej zależności między dawką promieniowania a czasem ekspozycji.

Czynniki fizyczne lub/i chemiczne o małej intensywności lub stężeniu mogą działać stymulująco lub hamująco w układach żywych, ale mechanizmy tego są nieznane. Zakłada się podstawy biochemiczne niespecyficznego odpowiedzi komórek jako zmiany energii metabolizmu. Przeprowadzono zatem badania mające na celu zebranie danych dotyczących wpływu na własności błony i hemostazę jonową promieniowania laserowego niskiej mocy (50 mW) w zakresie bliskiej podczerwieni (830 nm) w świeżo otrzymanych i metabolicznie uszkodzonych ludzkich płytkach, w których mierzono zmiany błonowe. Zastosowano całkowite dawki promieniowania w zakresie 2,8-172 kJ/m<sup>2</sup>. Na podstawie anizotropii fluorescencji znacznika TMA-DPH określano parametr uporządkowania lipidów przy powierzchni regionu polarnych główek błon plazmatycznej o wartości  $0,830 \pm 0,009$ . Zaobserwowano znaczące zmiany w średniej gęstości upakowania lipidów w płytkach podczas i po naświetlaniu zależne od rzeczywistego stanu metabolicznego komórek. Ujawnione zmiany okazywały się powoli odwracalne w czasie – parametr uporządkowania różny od kontrolnego (płytek nienaświetlanych) tuż lub nawet 5 min po naświetlaniu, a wielkość obserwowanych zmian była zależna od sposobu i częstotliwości naświetlania, dawki całkowitej, szybkości oddziaływania i natury komórek [50]. Światło o długości 830 nm przypuszczalnie

absorbowane jest przez cząsteczkę oksydazy C cytochromowej. Podejrzewanym mechanizmem działania jest zmiana stopnia utlenienia tego końcowego enzymu łańcucha oddechowego w następstwie wzbudzenia elektronowego jego absorbującego chromoforu  $Cu_A$ . Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni posądzane jest o indukowanie zmiany w tym redoks aktywnym centrum, pobudzając wzmocnienie szybkości przeniesienia elektronu. Jednostki absorbujące w błonie plazmatycznej komórek eukariontów są nieznane, chociaż błona komórkowa jest posądzana o udział w przewodzeniu sygnału świetlnego i wzmocnienie łańcucha stanowiącego wtórne mechanizmy działania lasera na poziomie komórkowym. Pokazywano, że światło lasera o długości 820 nm indukuje poprawę własności adhezyjnych błon komórkowych [51, 50].

Stosowanie lasera w środowisku krwi w zabiegu angioplastyki może uszkadzać nie tylko ściany tętnic, lecz także komórki krwi. Zaobserwowano wpływ działania lasera argonowego na krew i przypisano go denaturacji termicznej błon komórek skutkującej tworzeniem się złożonych siatkowatych konglomeratów. Porównanie wpływu lasera argonowego, Nd-YAG i lasera barwnikowego pompowanego laserem argonowym na płytki i erytrocyty *in vitro* wykazało szybki spadek liczby płytek już przy niskich energiach lasera podobnych przy naświetlaniu laserem Nd-YAG tylko dużą energią, tylko niewielkie zmiany liczebności po użyciu lasera barwnikowego. Transmisyjny mikroskop elektronowy ujawnił jednak uszkodzenia morfologiczne dla tych trzech laserów. Badania z wykorzystaniem lasera argonowego pokazały nasilenie agregacji przy względnie niskich poziomach naświetlania związanej prawdopodobnie z uwalnianiem ATP z uszkodzonych płytek, a przy wyższych poziomach energii (powyżej 200 J) agregacja została zniesiona z powodu zniszczenia płytek. We wszystkich testach naświetlanej laserem krwi w przygotowywanych PRP obserwowano spontaniczną agregację, którą w PRP (ale niepełnej krwi) hamowało przyjmowanie aspiryny. Kolejne doniesienia na temat badania wpływu działania lasera Nd-YAG (1060 nm) na funkcje płytek krwi przeprowadzono na próbki PRP naświetlanych promieniowaniem o energiach 10, 20, 30 i 50 J (stała moc promieniowania 10 W dostarczana przez 1, 2, 3 i 5 s). Wykazano spadek liczby płytek ze wzrostem dostarczonej energii i zależny od użytej sondy (sposobu dostarczenie promieniowania – różnice w dystrybucji ciepła), redukcję średniej objętości płytek ze wzrostem energii związaną z kurczeniem komórek z powodu dehydratacji termicznej lub odpornością starszych płytek, które są mniejsze, na działanie lasera. Spadek agregacji wywołanej ADP, kolagenem i ristocetyną obserwowano wraz ze zwiększaniem się mocy promieniowania bez różnic między sondami z wyjątkiem kolagenu, co częściowo może to wynikać ze zniszczenia znaczącej liczby płytek ze wzrostem mocy, a częściowo ze zniszczenia ultrastruktury

przekładającego się na obojętność na czynnik indukujący agregację. Nie zaobserwowano wpływu promieniowania lasera Nd-YAG na spontaniczną agregację [58, 75].

Ponieważ agregacja płytek krwi może być istotnym czynnikiem wykonalności laserowej angioplastyki przezcewnikowej, zbadano *in vitro* wpływ zwiększających się dawek promieniowania lasera CO<sub>2</sub> na liczbę, funkcje i ultrastrukturę powierzchni płytek krwi. Wyniki wskazują postępującą, zależną od dawki redukcję liczby i funkcji płytek po naświetlaniu. Zdjęcia ze skaningowej mikroskopii elektronowej naświetlanych płytek wykazały zależne od dawki promieniowania zmiany w pseudopodiach jak i wzrastające zniszczenia błony komórek [33]. Kolejne doświadczenia z ekspozycją płytek w PRP na promieniowanie laserowe CO<sub>2</sub> miały na celu sprawdzenie dodatkowego wpływu aspiryny. Naświetlania dokonano na dwa sposoby: krótką ekspozycją mieszanej próbki na dużą moc promieniowania (grupa I – 10W x 0,5s = 5J, 20W x 0,5s = 10J, 30W x 0,5s = 15J, 10W x 2s = 20J) i dłuższą ekspozycją na małą moc promieniowania (grupa II – 2W x 2,5s = 5J, 2W x 5s = 10J, 2W x 7,5s = 15J, 2W x 10s = 20J). Zaobserwowano ponownie zależny od dawki spadek liczby płytek, przy czym był on większy dla krótszego naświetlania promieniowaniem dużej mocy niż dłuższego małej mocy. Mimo że ablacja płytki miażdżycowej bardziej zależy od energii niż sposobu naświetlania, wykazano silniejsze działania krótkiego czasu promieniowania dużej mocy lasera CO<sub>2</sub> wywołującego większą destrukcję płytek, co potwierdza wzrost temperatury w tym trybie. Natomiast spadek agregacji płytek wywołanej ADP, kolagenem, ristocetyną i epinefryną wraz ze wzrostem dawki nie zależał od trybu naświetlania i był niezależny od spadku liczby płytek. Wyjaśnieniem mogą być wyniki badania ultrastruktury przy pomocy mikroskopii SEM i TEM pokazujące typowe i postępujące wraz z dawką zmiany ultrastruktury błony: obrazy SEM pokazały, że komórki kontrolne miały zachowaną błonę i pseudopodia, komórki naświetlane energią 5 J posiadały dłuższe pseudopodia, widoczne były uszkodzenia błon (nieciągłość) i tendencja do agregacji, naświetlanie energią 10 i 15 J powodowało wygładzenie i rozmywanie błon, skrócenie pseudopodiów i nasilenie tendencji do agregowania, natomiast zastosowanie dawki 20 J spowodowało rozległe uszkodzenia, znaczne rozmycie, zanik pseudopodiów i tendencji do agregacji; badanie z użyciem TEM ujawniły, że po zastosowaniu energii 5 J i wyższych wewnętrzna struktura została poważnie zniszczona uniemożliwiając identyfikację elementów wewnątrzkomórkowych (podobnie po zastosowaniu aspiryny). Dlatego niezależnie od trybu dostarczania promieniowania laserowego progowe zniszczenia błony i wnętrza komórek mogły być osiągnięte znacznie wcześniej niż uzyska się faktyczne zniszczenie płytek, a ponieważ agregacja zależy od integralności zarówno błonowej jak i wewnątrzkomórkowej, każdy sposób naświetlania może poważnie i w podobnym stopniu wpływać. Założenia

dodatkowego obniżenia albo wzmocnienia zdolności agregacji płytek po naświetlaniu komórek pochodzących od dawców przyjmujących aspirynę nie potwierdziły się dla dawek 5 i 10 J mimo spadku liczby płytek, co inne badania przypisały uwalnianemu z „nieszczelnych” płytek ATP, szybko zamienianego na wzmacniającego agregację ADP. Zastosowanie aspiryny nie wpływało znacząco na liczbę, stopień uszkodzenia funkcji i obrazy mikroskopowe płytek po naświetlaniu [34].

Badania *in vitro* zależności reakcji płytek krwi na fotoefekt od dawki energii światła laserowego i szybkości przepływu krwi w miejscu naświetlania wykazują, że promieniowanie podczerwone jest efektywne jedynie przy dużej szybkości przepływu prowadząc do zwiększonej adhezji i spadku agregacji płytek [16].

Porównanie skutków naświetlania krwi szczurzej monochromatycznym światłem LED o długości fali 880 nm dla rosnącej pojedynczej dawki zaczynając od 0,045 J/cm<sup>2</sup> wykazywało najsilniejszą inhibicję agregacji indukowanej ADP i adrenaliną po zastosowaniu najsłabszej dawki promieniowania [35].

### **3. Cel pracy i hipoteza badawcza**

Hemodializa obarczona jest wysokim ryzykiem wystąpienia licznych powikłań związanych z kontaktem krwi ze sztucznymi powierzchniami podczas krążenia pozaustrojowego. Uszkodzenia elementów morfotycznych krwi, powstawanie stresu oksydacyjnego, aktywacja nieswoistej odpowiedzi zapalnej oraz zaburzenia krzepnięcia to tylko kilka przykładów tych zaburzeń.

Studia literaturowe oraz uzyskane wcześniej wyniki badań *in vitro* w naszym zespole wykazały, że promieniowanie NIR działa ochronnie na erytrocyty oraz zmniejsza odwracalnie aktywność płytek krwi. Kolejnym krokiem było sprawdzenie ochronnego działania NIR w badaniach *in vivo*. Opierając się na uzyskanych wynikach mogę sformułować następującą hipotezę pracy:

#### **Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) zastosowane w odpowiedniej dawce działa ochronnie na płytki krwi podczas zabiegu hemodializy**

Celem naukowym niniejszej pracy doktorskiej jest zbadanie wpływu promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) na własności płytek krwi u zwierząt poddanych długotrwałej hemodializie (HD) i wykazanie jego ochronnego działania podczas krążenia pozaustrojowego. Ponadto w ramach pracy przedstawiono autorską metodę pomiaru agregacji płytek z wykorzystaniem znacznika spinowego, którą następnie wykorzystano w dalszych badaniach.

Realizację celu pracy doktorskiej została podzielona na kilka etapów:

Faza wstępna:

3. Dobranie modelu zwierzęcego hemodializy
4. Sprawdzenie przydatności wybranego modelu zwierzęcego do przeprowadzenia zabiegów HD
5. Opracowanie metodyki nefrektomii
6. Uzyskanie modelu mocznicy u zwierząt doświadczalnych

Faza zasadnicza:

7. Wykonanie szeregu eksperymentów hemodializy z zastosowaniem promieniowania NIR w czasie hemodializy i równolegle standardowo (bez naświetlania) u zwierząt klinicznie zdrowych oraz u osobników, u których została wykonana obustronna nefrektomia.

8. Wykonanie analizy stanu płytek uzyskanych z krwi owiec (poddanych nefrektomii) pobranej w czasie hemodializy prowadzonej z ekspozycją na promieniowanie NIR oraz standardowo (bez ekspozycji na NIR).
9. Ocena skuteczności zastosowania promieniowania NIR do ochrony płytek w czasie hemodializy.

Faza wstępna była wspólną częścią dla całego Zespołu uczestniczącego w realizacji projektu: Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej – Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Badania i Rozwój Nowoczesnych Technologii (Lider: Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu), projekt był realizowany w latach 2008–2013.

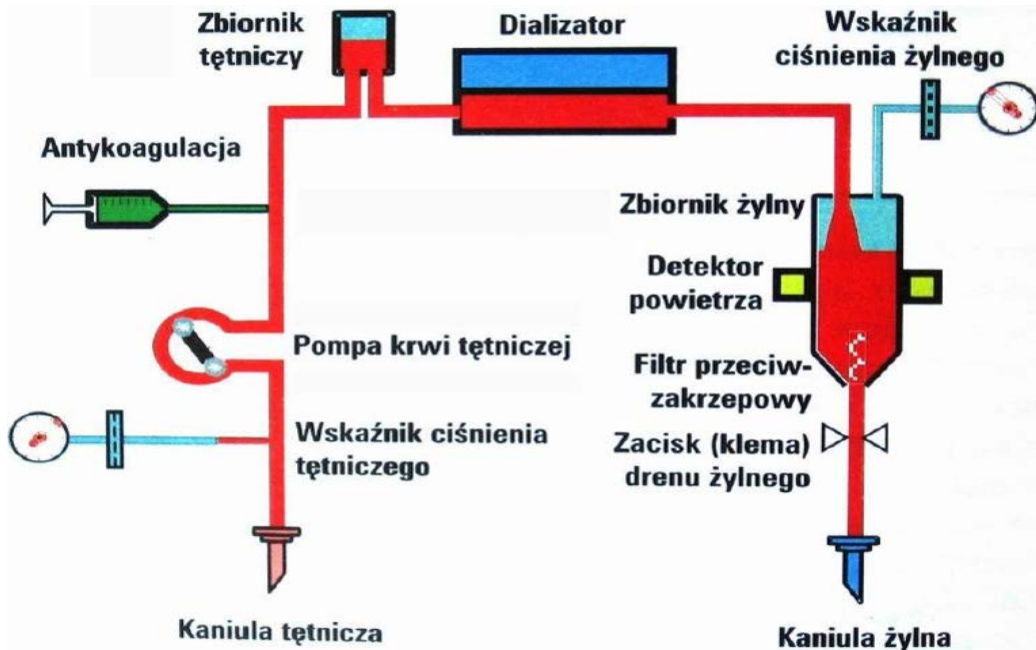
## 4. Materiały i metody badań

### 4.1. Przebieg doświadczeń na zwierzętach

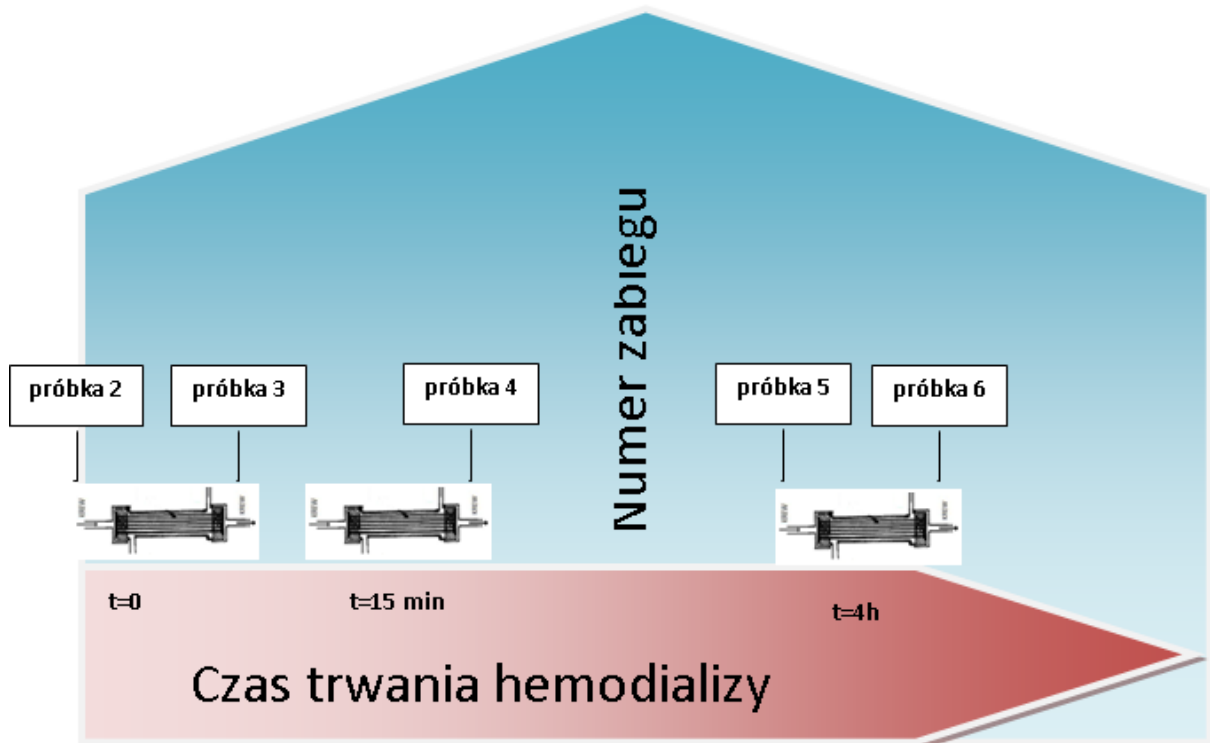
Doświadczenia były przeprowadzone na 12 baranach płci męskiej z gatunku Merino w wieku 16-18 miesięcy i początkowej masie 50,5-75,1 kg pozyskanych z tej samej hodowli [22]. Zwierzęta przechodziły dwuetapową obustronną nefroktomię z tygodniową przerwą między zabiegami [39]. Przed drugim zabiegiem wprowadzano żylny dostęp do hemodializy w postaci dwuświatłowego cewnika (Permanent 14.5 Fr × 28 cm dual-lumen Hemo-Flow Dialysis Catheter, Medcomp, USA). Po dobie od drugiego zabiegu usunięcia nerki zwierzęta przechodziły pierwszą z dziesięciu hemodializ. W zabiegach stosowane były urządzenia do hemodializy Fresenius 4008S (Fresenius Medical Care, Germany) wyposażone w standardowe linie krwi dla dorosłych i dializatory F5 HPS polysulfonowe low-flux dialyzers (Fresenius MC, Germany). Podczas zabiegów oczyszczania krwi (Rys. 4) maszyna dializacyjna zaopatrywana była w ultraczystą wodę mieszaną ze standardowym koncentratem dializacyjnym, alkalicznym dwuwęglanowym 8,4% koncentratem i koncentratem kwasowym SW 381 A ( $\text{Na}^+$  138 mmol/l;  $\text{K}^+$  3 mmol/l;  $\text{Ca}^{2+}$  1,5 mmol/l;  $\text{Cl}^-$  110 mmol/l;  $\text{Mg}^{2+}$  0,5 mmol/l; glukoza 1 g/l;  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  3 mmol/l;  $\text{HCO}_3^-$  32 mmol/l; B. Braun Avitum AG, Germany) dostosowanych indywidualnie według potrzeb. Przed rozpoczęciem hemodializy zwierzętom podawana była heparyna sodowa w postaci dożylnego bolusa w dawce 5000 I.U., natomiast podczas dializy stosowana była ta sama antykoagulacja ze stałą szybkością (1250 I.U./h) we wlewie tętniczym, której dawka była określana podczas wstępnych eksperymentów jak i na podstawie wyników aktywowanego czasu krzepnięcia mierzonych na 30 min przed zakończeniem procedury. Czas trwania każdej sesji hemodializy była zależny od masy ciała zwierzęcia i wynosił od 2 h 45 min do 3 h 45 min. Efektywna szybkość przepływu krwi była na poziomie między 271 a 371 ml/min, a ultrafiltracja między 200 ml a 2000 ml na sesję dializy. Pod koniec każdego zabiegu zmniejszono szybkość przepływu krwi do 100 ml/min na 2 minuty w celu uniknięcia cofania się oczyszczonej krwi. W trakcie eksperymentów zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i pożywienia. Poza próbką krwi pobieraną przed rozpoczęciem hemodializy (próbka nr 1) badaniu poddawane były próbki pobrane do probówki zawierającej 3,2% cytrynian sodu odpowiednio:

- na początku zabiegu z linii żyłnej (próbka nr 2, przed dializatorem) i tętniczej (próbka nr 3, za dializatorem);

- po ok. 15 min trwania procedury z linii żylniej, kiedy następowała najsilniejsza aktywacja układu odpornościowego (próbka nr 4);
- na koniec zabiegu z linii żylniej (próbka nr 5, przed dializatorem) i tętniczej (próbka nr 6, za dializatorem) - Rys. 5.



Rys. 4. Schemat układu eksperymentalnego (dializacyjnego) podczas pobierania próbek.



Rys. 5. Schemat ilustrujący czas i miejsce pobrania próbek.



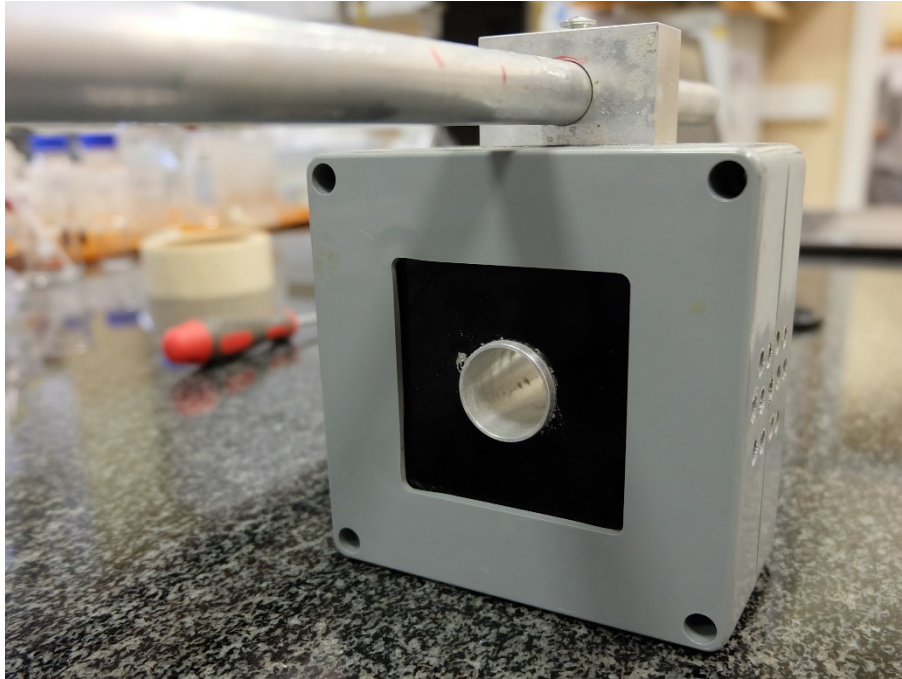
Próbki pobierano strzykawką minimalizując wywoływane tą procedurą zaburzenia i bez zbędnej zwłoki umieszczano w pojemniku z plastikowego materiału, by nie aktywować czynności płytek krwi. W zależności od przeznaczenia krwi do dalszej analizy była ona transferowana do probówki z odpowiednim antykoagulantem. W przypadku oceny zdolności agregacyjnych płytek antykoagulantem był 3,8% roztwór cytrynianu sodu w stosunku 1:9 (na jedną część antykoagulantu przypada 9 części krwi), który mimo własności chelatujących jony wapnia zapewniał wystarczające stężenie wapnia występującego w krwi do zapoczątkowania procesu agregacji. Jako antykoagulant krwi poddawanej analizie hematologicznej i przeznaczonej do pomiaru liczności płytek krwi stosowano roztwór wersenianu disodowego ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ), natomiast krew służąca do pomiaru jej składu jonowego pobierano na heparynę.

#### **4.2. Preparatyka osocza bogatopłytkowego (Platelet Rich Plasma, PRP) z krwi pełnej**

Pipetowano po 1 ml krwi (lub 1,5 ml, jeżeli było dostępne więcej materiału) do probówek polipropylenowych stożkowodennych typu Eppendorf z zamknięciem o objętości 1,5 ml, a następnie wirowano w wirówce laboratoryjnej chłodzonej MPW-350RS przy użyciu wirnika kątownego  $45^\circ$  o numerze 11462 z maksimum 18000 obr/min przez 20 minut z prędkością 1500 obrotów/min. (co daje przyspieszenie  $209\times g$ ) w temperaturze pokojowej. W zależności od hematokrytu pipetowano ok. 0,5–0,6 ml supernatantu, które stanowiło produkt PRP z krwi pełnej.

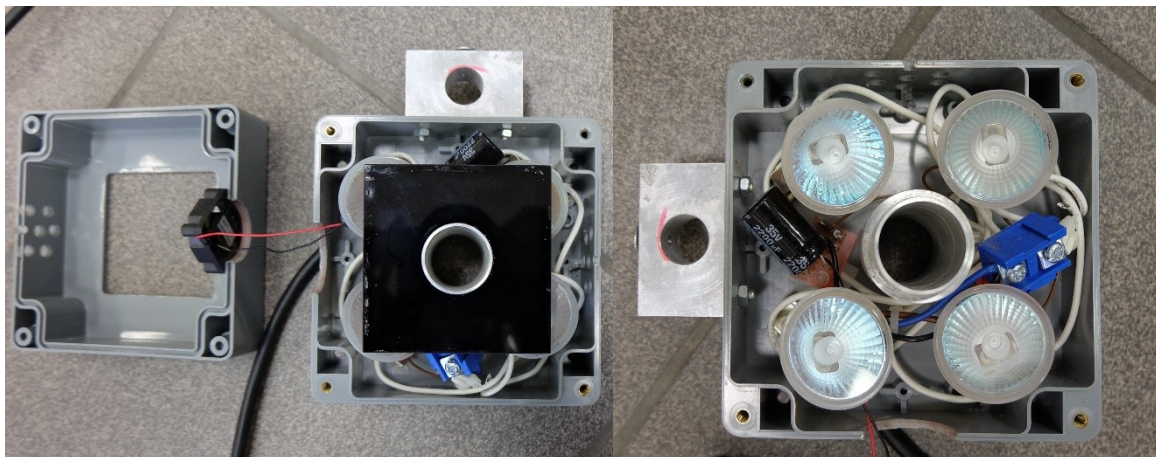
#### **4.3. Naświetlanie NIR**

W grupie badawczej NIR krew znajdująca się w pozaustrojowym obiegu była naświetlana promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni. Napromiennik (Rys. 6) do naświetlania krwi w układzie krążenia pozaustrojowego hemodializy, bazuje na filtrach podczerwieni NIR IFG 098 firmy Schneider-Kreuznach oraz matowych żarówkach halogenowych z reflektorami.



Rys. 6. Napromiennik służący do uzyskiwania promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni.

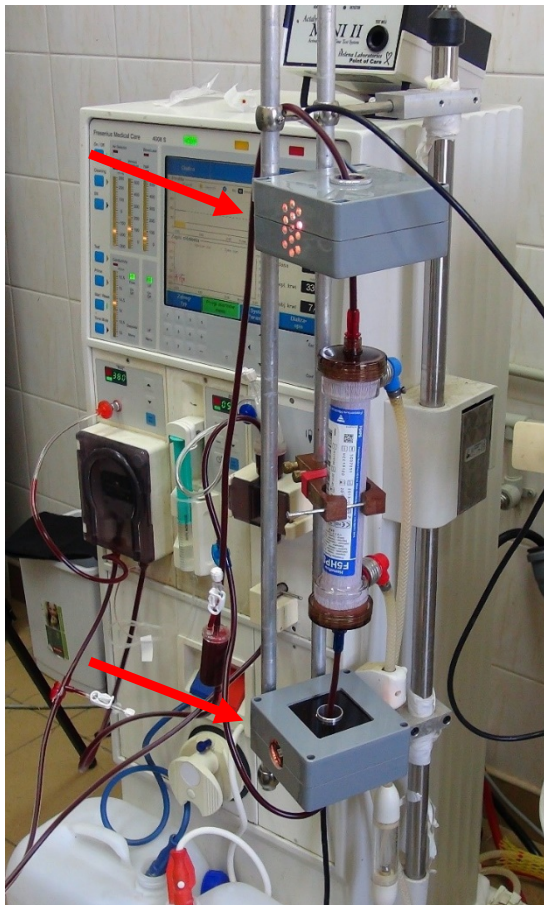
Promieniowanie wychodzące z napromiennika było emitowane przez żarówki halogenowe, następnie rozpraszane za pomocą dyfuzora i przepuszczane przez filtr podczerwieni w sposób selektywny. Na wyjściu napromiennika powierzchnię promieniowania NIR ograniczał kwadrat o wymiarach 65mm x 65mm. Żarówki zamontowane były w każdym z rogów obudowy i ustawione pod kątem 30 stopni. Całość znajdowała się w obudowie o wymiarach 120mm x 120mm x 60mm (Rys. 7). Rozmiar napromiennika dostosowany był do oświetlanej powierzchni, a średnica głowicy dializatora wynosiła 60 mm.



Rys. 7. Konstrukcja napromiennika NIR.

Zastosowanie żarówek z reflektorami oraz wentylatora pozwoliło na skuteczne ograniczenie kumulacji ciepła każdego emitera NIR. W osi pionowej napromienników

znajdowały się otwory o średnicy 25mm, przez które przechodziły drenaży. Ściany otworów wykonane były z grubych tulei aluminiowych, co chroniło drenaży przed światłem widzialnym oraz ciepłem emitowanym przez żarówki halogenowe. Temperatura zmierzona wewnątrz tulei nie przekraczała 37°C.

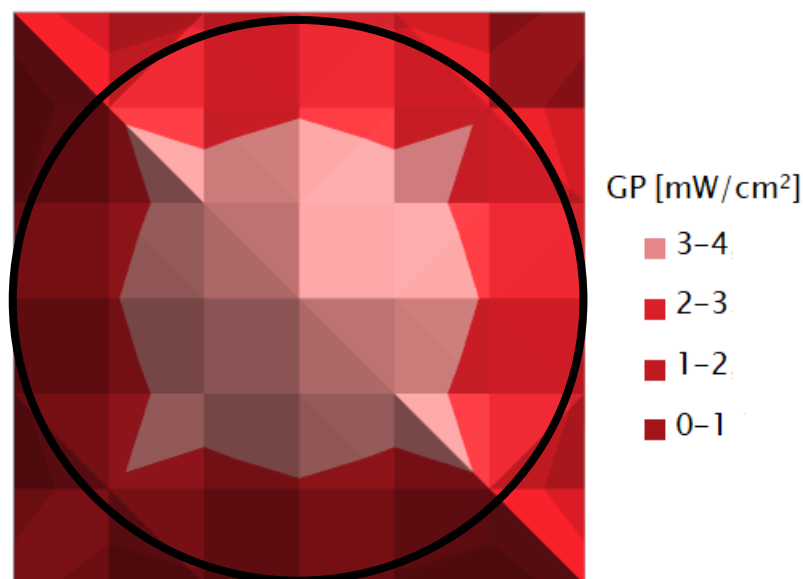


Rys. 8. Napromienniki NIR w trakcie zabiegu hemodializy umocowany prostopadłe do dializatora.

Najbardziej optymalnym miejscem naświetlania był dializator. Emitery NIR umieszczone były po dwóch stronach dializatora - na wejściu i wyjściu linii krwi (Rys. 8). Prędkość przepływu krwi w tym miejscu jest najmniejsza, a powierzchnia dostępu dla promieniowania największa. Ściany obudowy komory są transparentne dla promieniowania NIR. Do naświetlania powierzchni membrany dializacyjnej zastosowałam dwa napromienniki, uzyskując dzięki temu większą powierzchnię ekspozycji krwi na NIR. Emitery NIR umocowane były na szynach współosiowo w odległości 460 mm od siebie, a 100mm od głowic dializatora (długość dializatora 26cm).

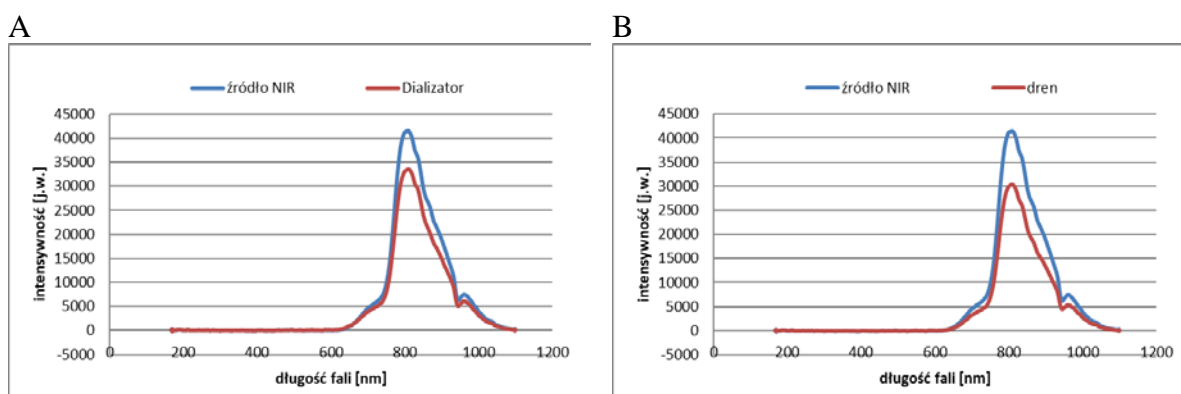
Wynaczyniona krew była poddana procedurze naświetlania przez cały zabieg hemodializy. Całkowita pochłonięta dawka—promieniowania NIR wyniosła  $0,81 \text{ J/cm}^3$  w pełnym zasięgu promieniowania. Rozkład gęstości mocy promieniowania (Rys. 9) emitowanego przez napromiennik NIR mierzony był dla napięcia zasilającego 230V [133].

Powierzchniowa gęstość mocy wynosiła maksymalnie  $4 \text{ mW/cm}^2$  na płaszczyźnie membrany dializacyjnej. Charakterystyka ta wyznaczona jest dla promieniowania, które przeszło przez obudowę dializatora.



Rys. 9. Rozkład gęstości mocy promieniowania NIR na powierzchni membrany dializacyjnej. Źródło: na podstawie [130 i 133].

Badania charakterystyki widmowej (Rys. 10) napromiennika NIR oraz właściwości optycznych polimerów stosowanych do produkcji drenów i dializatorów wykazały brak zniekształceń kształtu widm transmisyjnych polimerów względem widma emisyjnego napromiennika NIR. Badane materiały nie posiadały widm absorpcyjnych w ponad 400nm zakresie widmowym. Zaobserwowano jedynie efekt zmiany intensywności promieniowania będący skutkiem wyłącznie rozproszenia i tłumienia promieniowania NIR na powierzchniach naświetlanych polimerów [146].



Rys. 10. Charakterystyka widmowa źródła promieniowania, dializatora (A) i drenów (B). Źródło: na podstawie [130].

#### **4.4. Ocena własności agregacyjnych płytek w krwi pełnej metodą impedancyjną**

Badanie agregacji płytek krwi przeprowadzono z użyciem dwukanałowego agregometru Chrono-log 700 Series Whole Blood Lumi-Aggregometer mogącego pracować jako agregometr fotometryczny, wykorzystując osocze bogatopłytkowe, albo impedancyjny analizujący elektryczną impedancję krwi pełnej. Pomiaru impedancji (opór elektryczny) w kuwecie zawierającej próbkę pełnej krwi dokonuje się poprzez zanurzenie odpowiedniej elektrody zbudowanej z dwóch przewodów z metali szlachetnych. W obwodzie przepływa prąd zmienny mierzony w miliwoltach [mV], a urządzenie pomiarowe mierzy impedancję układu wyrażoną w Ohmach [ $\Omega$ ]. Po krótkim czasie ustala się równowaga i na przewodach powstaje pojedyncza warstwa płytek krwi, co świadczy o stałej wartości impedancji charakteryzującej układ. Wskutek dodania czynnika stymulującego aktywność płytek powstaje kolejna warstwa i tym samym dochodzi do wzrostu impedancji układu, której zmiana w czasie zostaje zarejestrowana za pomocą oprogramowania Chrono-log AGGRO/LINK8. Badanie agregacji płytek krwi metodą impedancji pozwala na analizę procesu w środowisku krwi pełnej z uniknięciem kolejnych zabiegów przygotowawczych wpływających na wynik badania.

Do pomiarów były wykorzystywane materiały (plastikowe kuwety P/N 367 i jednorazowe mieszadła P/N 370 dla krwi pełnej) i agoniści (P/N 385 CHRONO-PAR kolagen i P/N 384 CHRONO-PAR ADP rekonstruowane zgodnie z zaleceniami) zakupione i przeznaczone do tego urządzenia.

Po włączeniu agregometru odczekano, aż temperatura bloków grzejnych osiągnie 37 °C. W tym czasie elektroda pomiarowa była wstępnie ogrzewana poprzez umieszczenie jej w kuwecie w otworach wstępnego ogrzewania. W otworach wstępnego ogrzewania ogrzewano także kuwety z umieszczonym mieszadłem, które w testach pełnej krwi wypełniano 450  $\mu$ l soli fizjologicznej i po osiągnięciu gotowości do pomiaru uzupełniano 450  $\mu$ l próby badanej. Przed pipetowaniem probówkę z krwią każdorazowo delikatnie przechylano w celu równomiernego rozkładu komórek. Kuwety z badaną próbą krwi wymieszaną z solą fizjologiczną następnie grzano przez kolejne 5 minut w otworach inkubacyjnych. W metodzie impedancyjnej tryb pomiaru urządzenia ustawiony był na IMPEDANCE. Osuszoną ogrzaną elektrodę pomiarową umieszczano w ogrzanej kuwecie zawierającą rozcieńczoną próbkę (900  $\mu$ l) w odpowiednich kanałach pomiarowych, a końcówkę przewodu elektrody wkładano w gniazdo znajdujące się w komorze pomiarowej. Następnie dokonywano kalibracji sygnału dla każdego używanego kanału pomiarowego i ustawiano linię bazową na 0% i wzmacnienie na 50%. W przypadku badania agregacji wywołanej ADP w tym etapie przygotowań do

rozcieńczonej krwi dodawano 50  $\mu$ l 25 mM roztworu chlorku wapnia w celu spotęgowania działania tych agonistów i ponownie kalibrowano poziom wzmocnienia sygnału. Po ustabilizowaniu linii bazowej w kanałach pomiarowych, zatrzymaniu pomiaru, wyborze opcji Restart Current Test i uwidocznieniu poziomu wzmocnienia w momencie pojawienia się linii bazowej dodawano odczynnik powodujący agregację: 2  $\mu$ l kolagenu (co daje 2  $\mu$ g/ml koncentracji finalnej) lub 10  $\mu$ l ADP (koncentracja finalna 10  $\mu$ M). Pomiar prowadzono przez około 16 minut w celu monitorowania maksymalnego stopnia agregacji. W przypadku prowadzenia badań na większej ilości próbek w czasie trwania pomiaru przygotowywano kolejne próby dla każdego kanału i rozpoczynano ich wstępną inkubację. Każdy pomiar kończono określając punkty początkowe tuż po dodaniu agonistów i końcowe w przebiegu zmian impedancji dla każdej badanej próbki, które posłużyły do dokonywanego przez oprogramowanie automatycznego obliczania pola powierzchni pod zarejestrowaną krzywą będącą miarą zdolności płytek do indukowanej agregacji.

#### **4.5. Autorska metoda pomiaru agregacji płytek z wykorzystaniem znacznika spinowego**

##### **4.5.1. Podstawy metody**

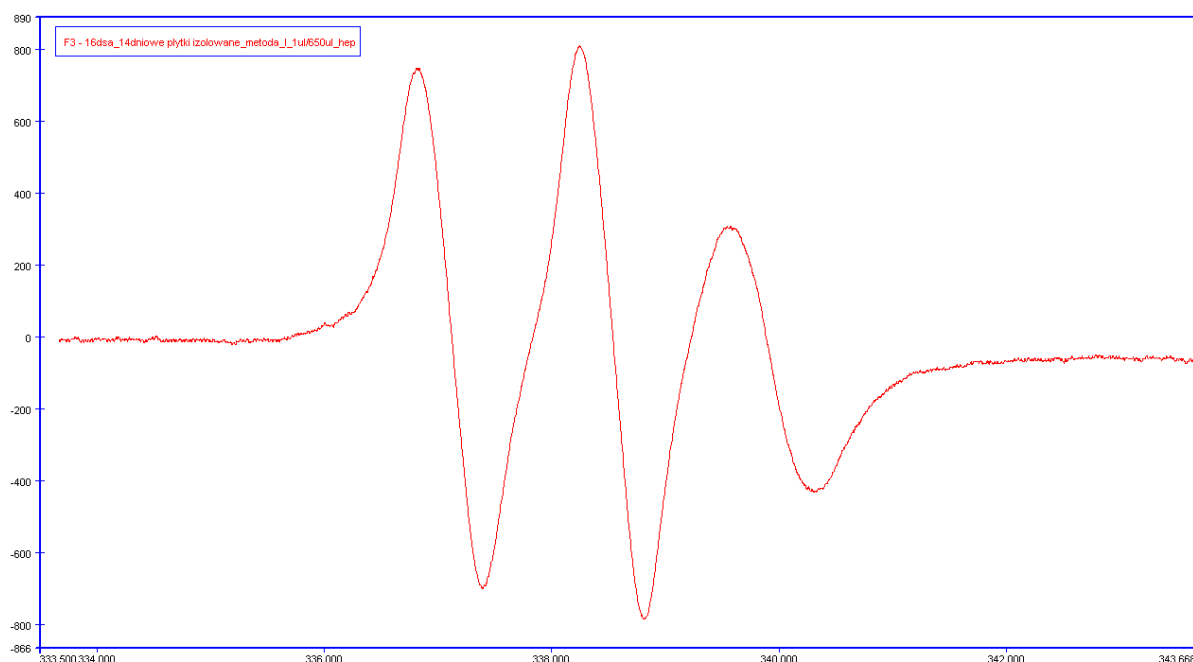
W świetle przedstawionego procesu aktywacji płytek na szkle zrodziło się pytanie, czy jesteśmy w stanie zmierzyć zmiany płynności błony zachodzące na skutek kontaktu płytek ze szkłem. Do tego celu została wykorzystana metoda sond spinowych w spektroskopii EPR. Do aktywacji powierzchniowej płytek postanowiono wykorzystać szklane kapilary hematokrytowe często stosowane w badaniach spektroskopowych EPR próbek płynnych z dużą zawartością wody, w których niewielka średnica kapilar skutecznie ograniczała niepożądaną absorpcję promieniowania mikrofalowego przez cząsteczki wody. Do badania zmian płynności błony płytek w produkcie bogatopłytkowym zastosowano sondę nitroksylową pochodną kwasu 16-doksylostearynowego (16-DSA) dyfundującego do dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej z grupą reporterską znajdującą się w połowie dwuwarstwy, w odpowiednim stężeniu dobranym przed realizacją eksperymentu i każdorazowo po rekonstytucji nowego odczynnika (25 mg sondy firmy Sigma lub TCI Chemicals roztworzano 98% roztworem etanolu o objętości 2 ml – średnio kilka  $\mu$ l sporządzonego roztworu 16-DSA na 150  $\mu$ l PRP. Po dodaniu znacznika do PRP próbkę wytrząsano przez 20 minut w termomikserze MHR 11 HLC BioTech z prędkością ok. 500 obr/min i tak wyznakowanymi płytkami napełniano nieheparynowane szklane kapilary zatykane niedającym sygnału pszczelim woskiem lub szczeliwem Bruker X-Sealant (Catalog



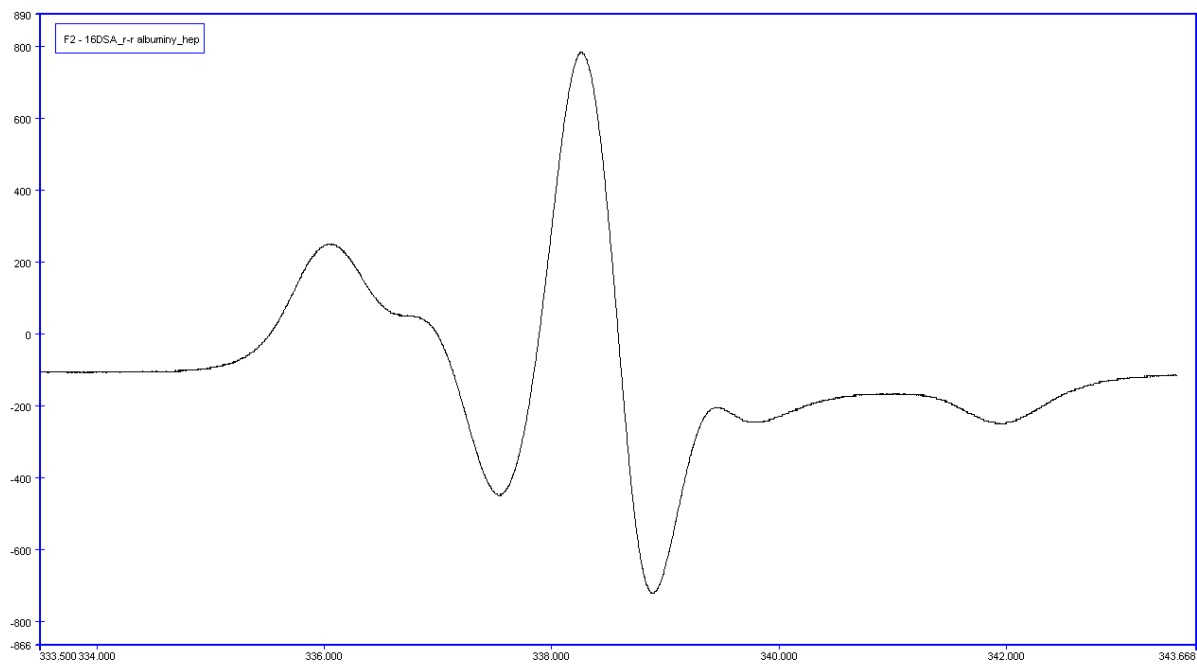
No. 6130900) dedykowanym pomiarom w spektrometrze EPR. Po zestrojeniu spektrometru dokonano rejestracji widma. Otrzymane widmo EPR posiada charakterystyczny kształt trypletu odzwierciedlający obecność niesparowanego elektronu w pobliżu magnetycznego jądra  $N^{14}$  (Rys. 11).

#### 4.5.2. Widmo i jego składowe

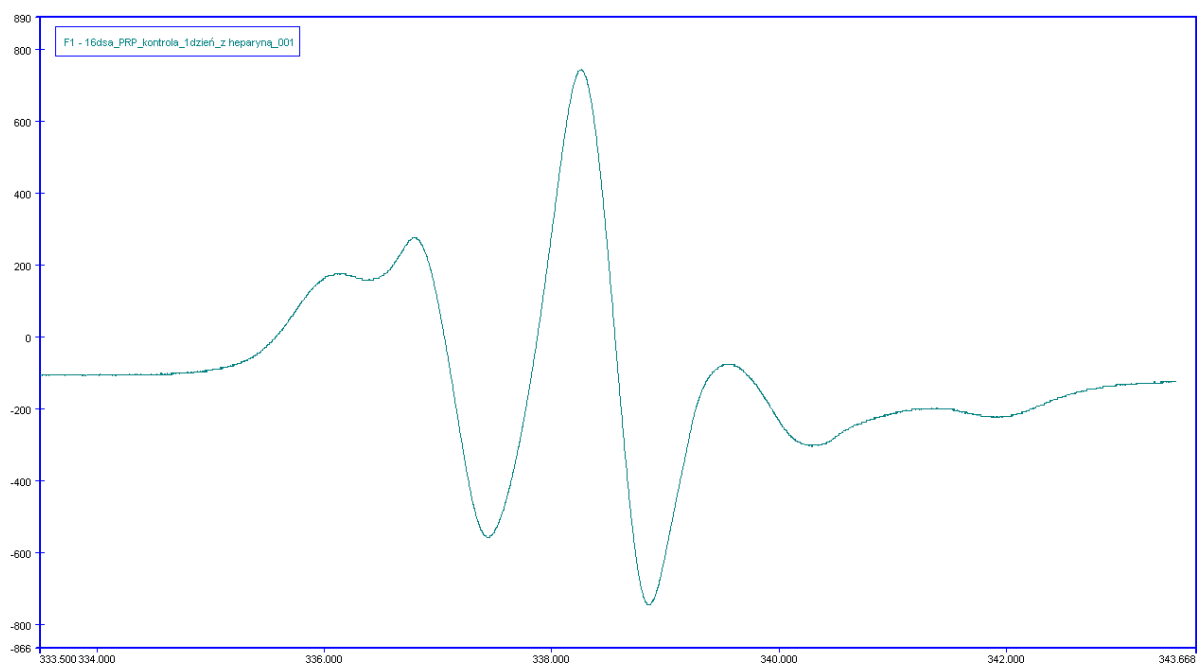
W celu dokonania interpretacji zarejestrowanego widma z materiału bogatopłytkowego wyizolowane zostały płytki metodą powtarzanego wirowania i płukania, które następnie zostały wyznakowane tą samą sondą (Rys. 11). Z drugiej strony jako zbliżone środowisko, w którym znajdują się płytki w produkcie bogatopłytkowym, przygotowano roztwór albuminy, białka o największym stężeniu w osoczu i dodatkowo wiążącym w nim między innymi kwasy tłuszczowe, do którego także została wprowadzona sonda 16-DSA (Rys. 12, Rys. 13). Zestawienie ze sobą uzyskanych widm (Rys. 14) czytelnie pokazuje pochodzenie i wkład pasm pochodzących od poszczególnych elementów do widma uzyskanego z materiału bogatopłytkowego.



Rys. 11. Widmo: 14-sto dniowe płytki wyizolowane metodą powtarzanego wirowania i płukania znakowane sondą 16-DSA.

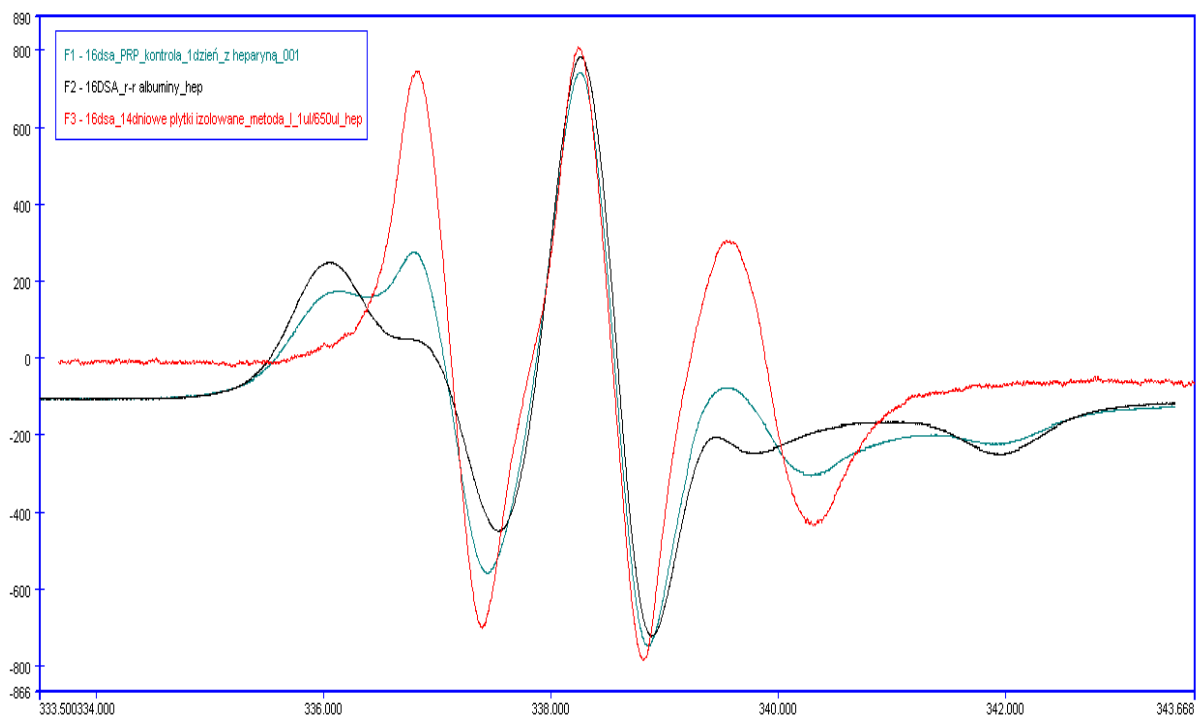


Rys. 12. Widmo: roztwór albuminy, do którego także została wprowadzona sonda 16-DSA.



Rys. 13. Widmo: płytki w PRP z wprowadzoną sondą 16-DSA.

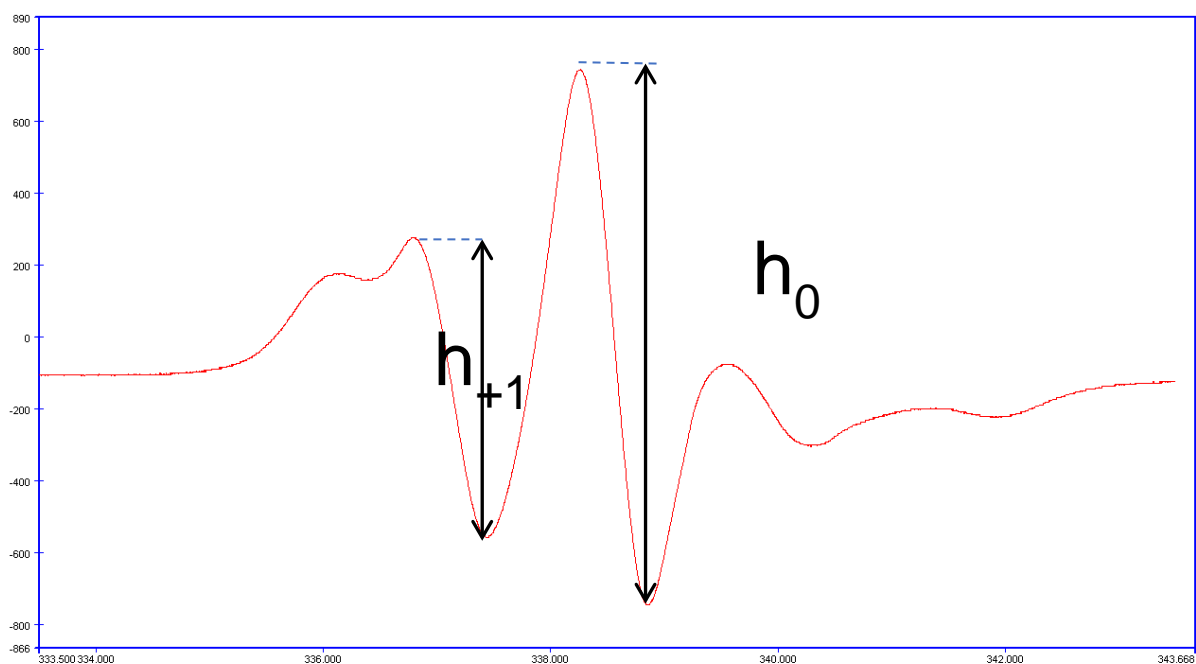




Rys. 14. Zestawienie (nałożenie) widm pokazanych powyżej (opis w tekście).

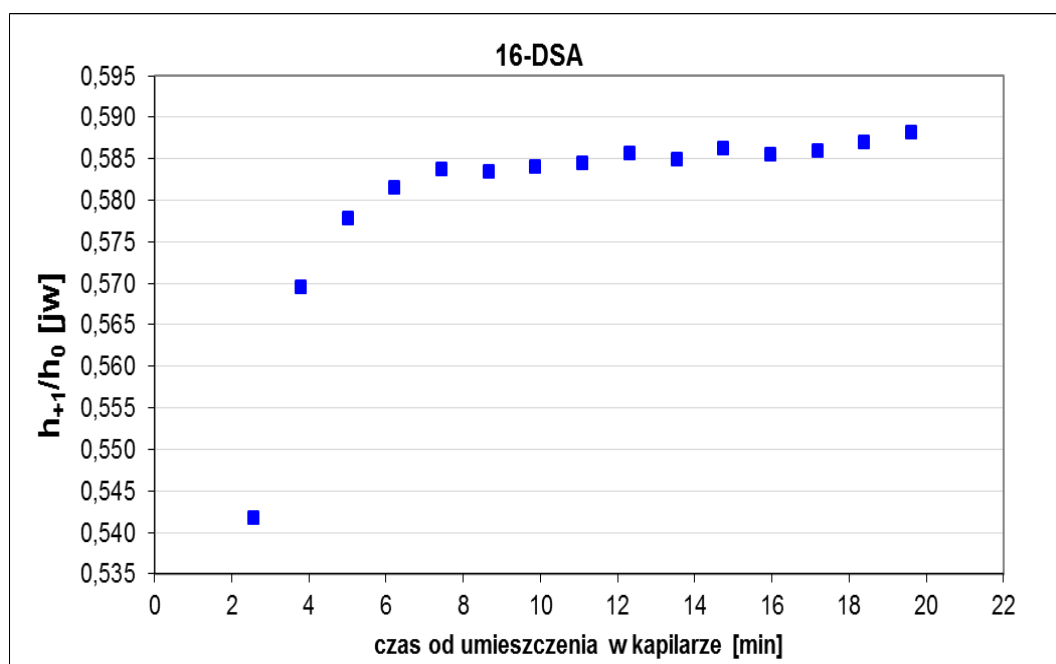
#### 4.5.3. Dynamika zmian. Wyznaczane parametry

Widać, że stosunek amplitudy sygnału niskopoleowego  $h_{+1}$  do amplitudy sygnału centralnego  $h_0$  wyraża własność płytek w tak złożonym widmie, a jednocześnie  $h_{+1}/h_0$  charakteryzuje ruchliwość znacznika w dwuwarstwie lipidowej i płynność błony komórkowej płytek [65].



Rys. 15. Amplituda sygnału niskopoleowego  $h_{+1}$  i amplituda sygnału centralnego  $h_0$ .

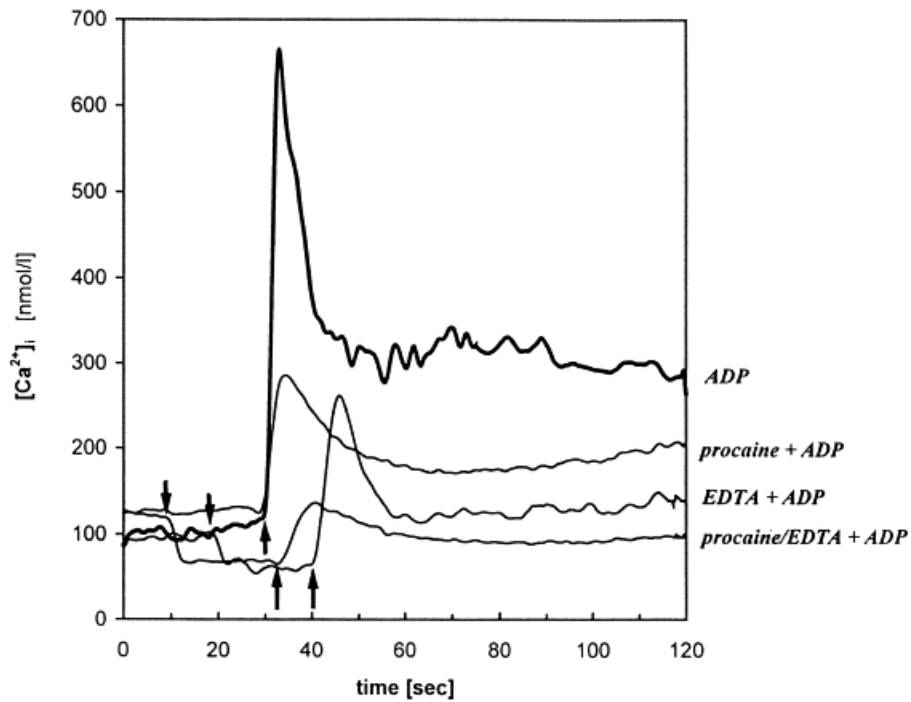
Dlatego też jako parametr charakteryzujący dynamikę płytek wyznaczano stosunek amplitudy sygnału niskopolewego  $h_{+1}$  do amplitudy sygnału centralnego  $h_0$ . Im większa wartość parametru, tym większa ruchliwość znacznika w dwuwarstwie lipidowej, co przekłada się na większą płynność błony komórkowej płytek. Tym samym możliwość badania własności płytek krwi w materiale bogatopłytkowym pozwala na uniknięcie konieczności izolacji płytek, a jednocześnie nie doprowadza się do ich aktywacji wskutek wielokrotnego zwirowywania. Ponieważ w procesie aktywacji dochodzi do przejściowych zmian w komórce, zostało sprawdzone, czy proces ten uwidoczni się także w postaci zmian zachodzących w błonie płytek w czasie aktywacji wywołanej kontaktem ze szkłem poprzez rejestrację kolejnych widm od momentu umieszczenia komórek w szklanej kapilarze, zaczynając pomiar czasu od momentu kontaktu komórek ze szkłem. Otrzymywane na tej podstawie krzywe przedstawiały zależności zmian widma znacznika 16-DSA w czasie kontaktu płytek ze szkłem – wyznaczany z widm parametr  $h_{+1}/h_0$  wykazał ewolucję wartości wraz czasem kontaktu płytek ze szklaną powierzchnią (Rys. 16).



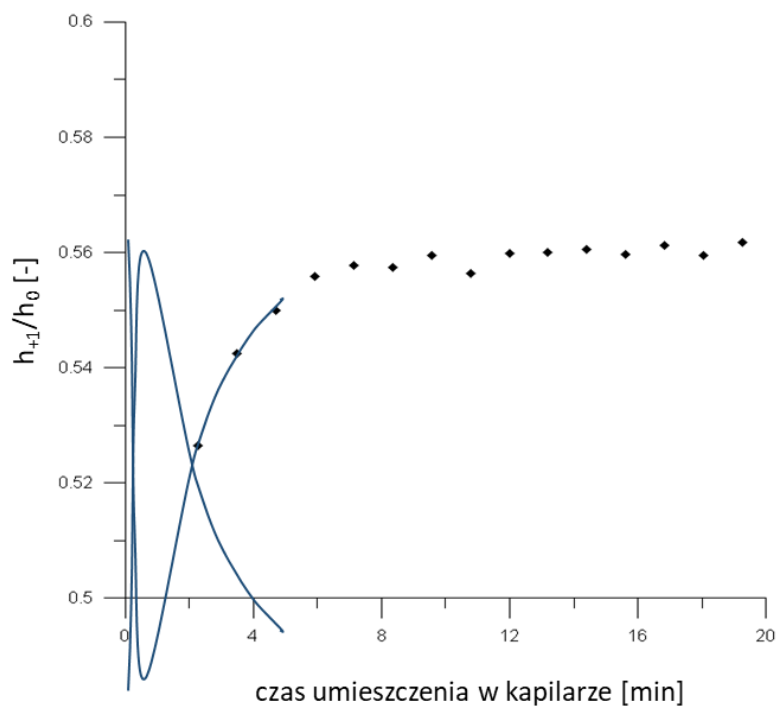
Rys. 16. Kinetyka zmian wyznaczonego z widm znacznika 16-DSA parametru  $h_{+1}/h_0$  w czasie kontaktu płytek ze szkłem.

Kinetyka zmian tego parametru demonstruje jego wzrost świadczący o wzrastającej ruchliwości znacznika w dwuwarstwie lipidowej i tym samym rosnącej płynności błony komórkowej płytek, po czym następuje uzyskanie przez niego stanu równowagi. Na podstawie krzywych przebiegu zmian tego stosunku reprezentujących kinetyki aktywacji możliwe jest określenie czasu potrzebnego do osiągnięcia przez płytki stanu równowagi oraz wartości

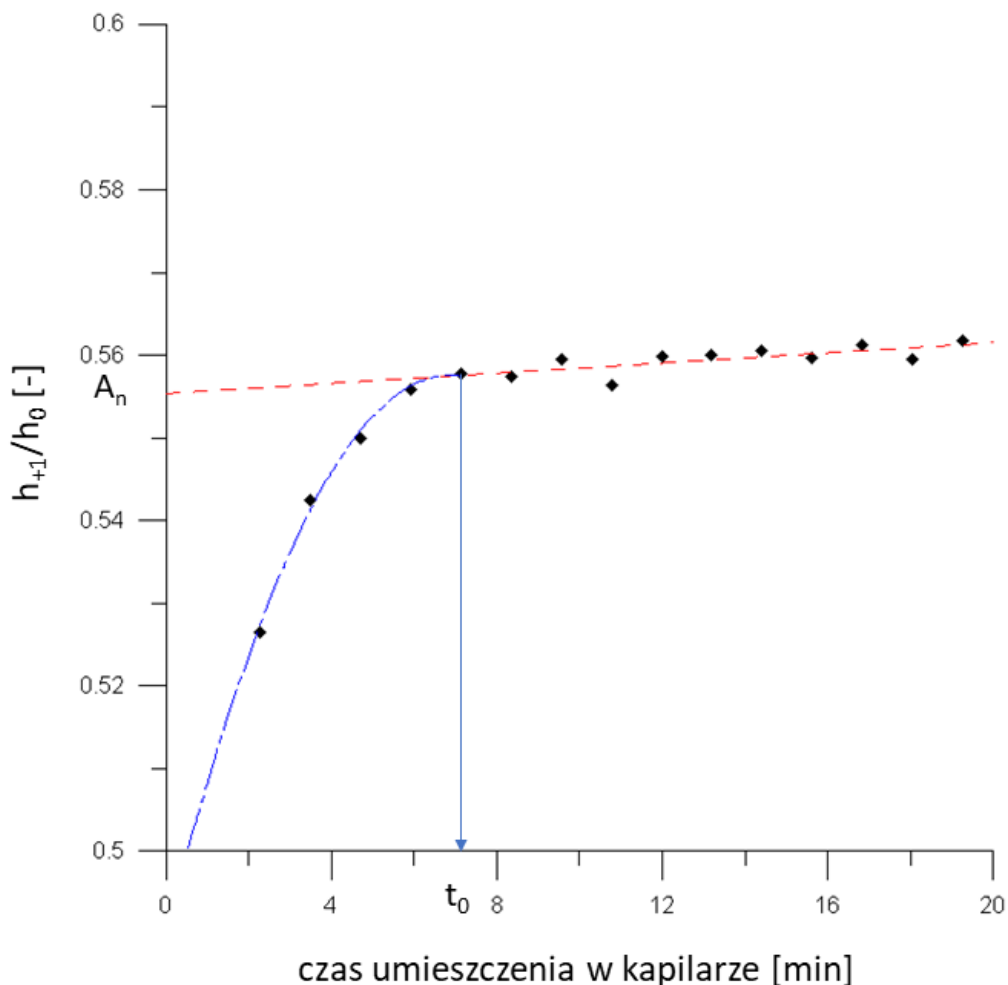
stosunku  $h_{+1}/h_0$  w tym stanie, kiedy stężenia wapnia wraca do stanu początkowego (Rys. 17) [140].



Rys. 17. Przykład zmian w  $Ca^{2+}$  i zarejestrowanych przez intensywność fluorescencji ludzkich płytek krwi inkubowanych z prokainą przed dodaniem EDTAK2 i ADP. Przedziały czasowe, w których do pożywki inkubacyjnej dodawano EDTAK2 i ADP, zaznaczono odpowiednio ↓ i ↑. Dane wygładzone przy użyciu oprogramowania Perkin-Elmer LS50B [118].



Rys. 18. Zmiany stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego zarejestrowane w czasie aktywacji płytek zestawione ze zmianami rejestrowanymi z widm znacznika 16-DSA w czasie kontaktu płytek ze szkłem.



Rys. 19. Idea wyznaczenia parametrów określających aktywność badanych komórek poprzez dopasowanie funkcji wielomianowej (linia niebieska, kreska-punkt) i linii prostej (linia czerwona, kreskowa).

Dlatego zostały zaproponowane charakterystyczne parametry ilościowe określające aktywność badanych spektroskopowo komórek wyznaczone przy pomocy dopasowania do punktów pomiarowych (Rys. 19):

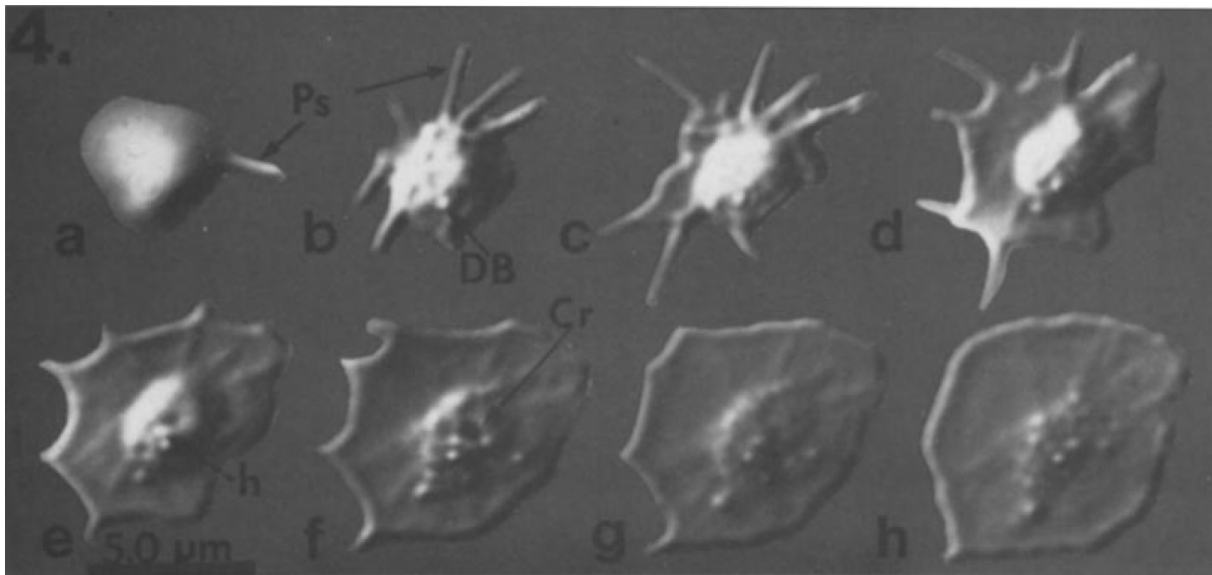
- funkcji wielomianowej drugiego stopnia w części wzrastającej krzywej, która posłużyła do określania czasu  $t_0$ , po jakim komórka osiąga stan względnej równowagi,
- linii prostej w części krzywej osiągającej stabilizację, na podstawie której wyznaczano wartość stosunku  $h_{+1}/h_0$  w stanie równowagi płytek ( $A_n$ ).

Im większa jest wartość parametru  $A_n$  i tym samym płynność błony komórkowej płytek, tym mniejsza jest ich aktywacja. W przedstawionej metodzie oceny aktywacji płytek wywołanej kontaktem ze szkłem pomiary spektroskopowe były przeprowadzane z wykorzystaniem spektrometru EPR produkcji Politechniki Wrocławskiej z modułem mikrofalowym MX-202R i modułem przemiatającym  $\mu P$  S2-036M pracującym w paśmie X.

Wartości rejestrowane były przy następujących parametrach: amplituda modulacji – 0,63 mT, pole centralne – 338,5 mT, szerokość przemiatania – 10 mT, czas przemiatania – 64 s, stała czasowa – 0,3 s, z wykorzystaniem opcji automatycznej rejestracji widm w odstępie czasowym co 2 s, notując czas jaki upłynął od napełnienia kapilary do zakończenia pierwszego przemiatania. Pomiary wykazały, że proces ustalenia się stanu równowagi zostaje osiągnięty w czasie ok. 20 minut od momentu wprowadzenia wyznakowanego preparatu do szklanej kapilary (punkt startowy, czas 0), dlatego dokonywano rejestracji 15 widm.

#### 4.5.4. Weryfikacja metody. Porównanie z innymi technikami

Powierzchniowej aktywacji płytek towarzyszy wieloetapowa zmiana kształtu, która ma miejsce w procesie adhezji (Rys. 20) [5].

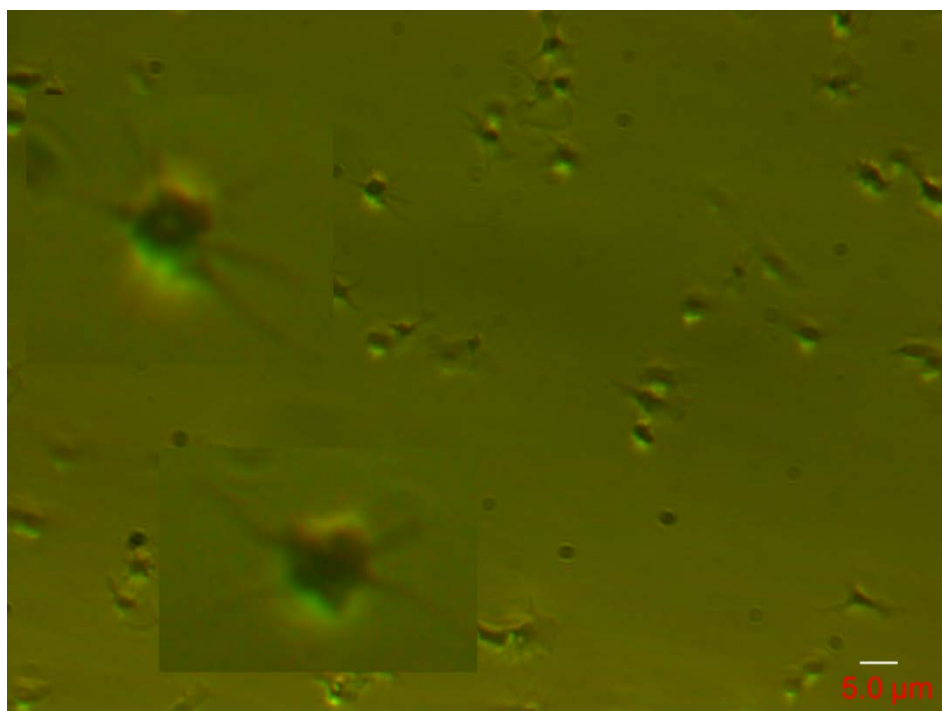


Rys. 20. Ta sama płytka w różnych stadiach jej przemiany z formy sferoidalnej tuż po zetknięciu z podłożem (a) do postaci w pełni rozłożonej (h). Czasy wykonywania mikrofotografii to 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8 i 13 minut dla etapów a-h. Widoczne struktury obejmują pseudopodia (Ps), ciała gęste (DB) i krater (Cr) [5].

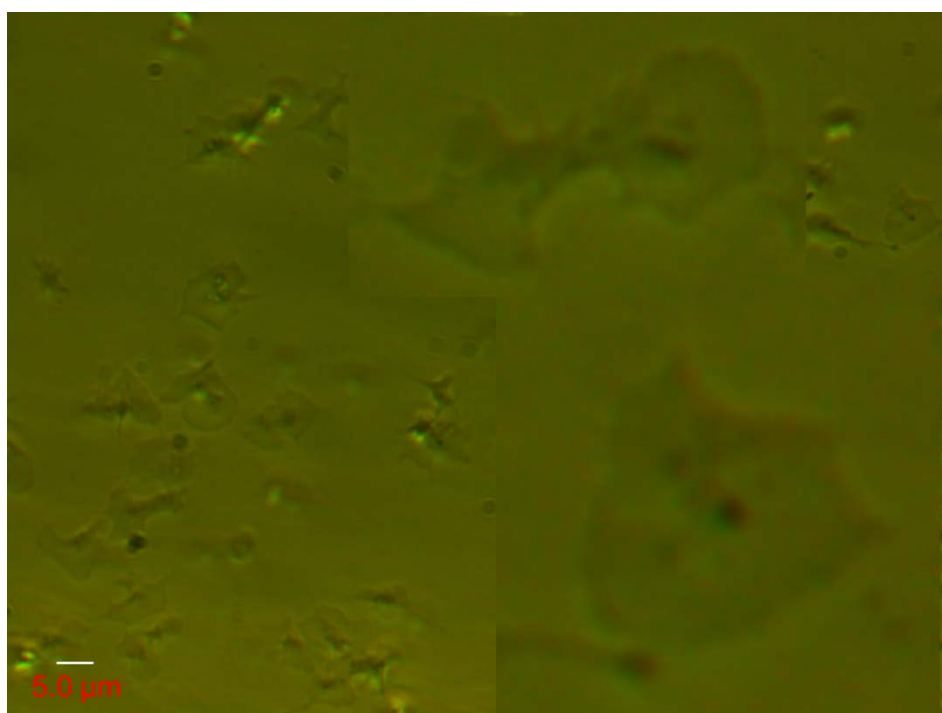


Rys. 21. Etapy adhezji płytek; skaningowy mikroskop elektronowy: płytka spoczynkowa o kształcie dyskoidalnym, tuż po zetknięciu z podłożem (a), wczesna postać aktywacji, zmiana kształtu i emisja pseudopodiów – forma 1 (b), późna forma aktywacji, płytka rozłożona, przylegająca do szkła, całkowicie rozpostarta – forma 2 (c) [<http://www.platelet-research.org>, dostęp: 30.03.2021].

To samo dzieje się w płytkami na powierzchni szkła. A zatem zmiany rejestrowane w widmach towarzyszą przekształcaniu się postaci płytek z nieaktywowanych w płytki przylegające do szkła i mające postać całkowicie rozpostartych (*fully spread*, Rys. 21).

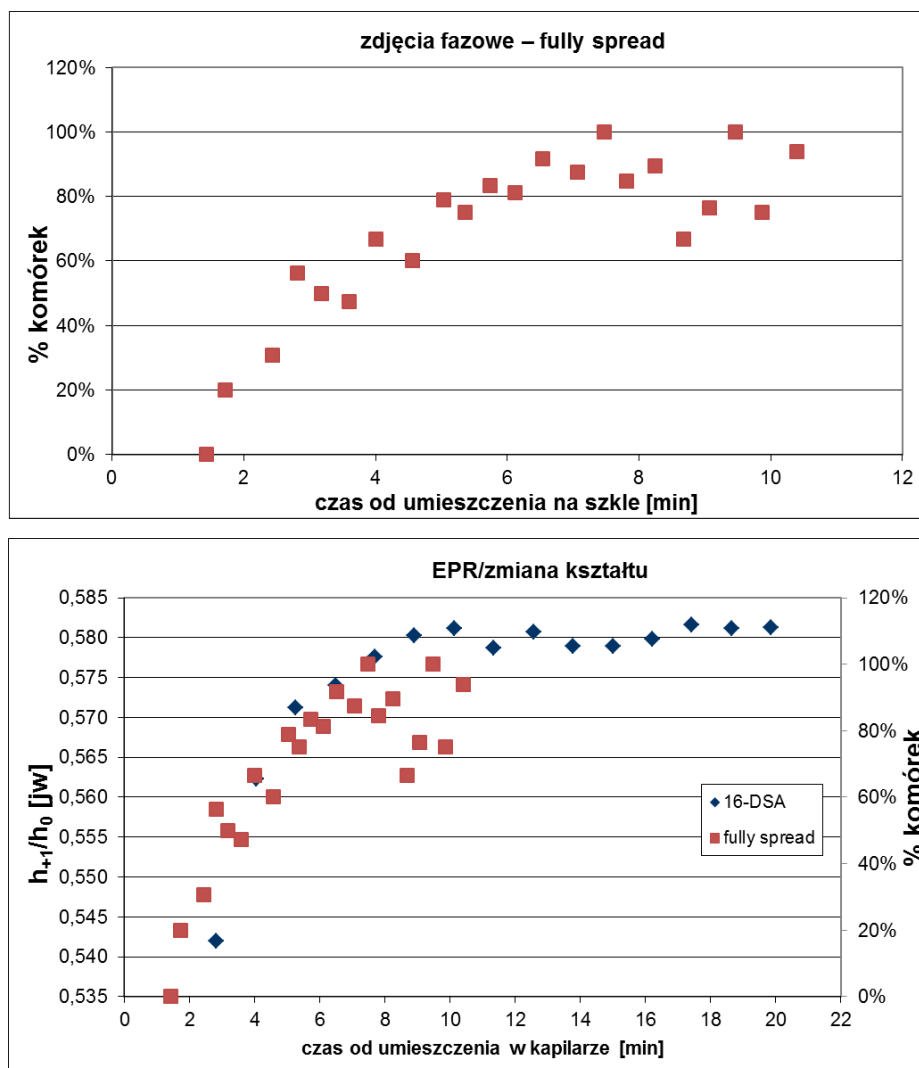


Rys. 22. Adhezja płytek do powierzchni szkła: zmiana kształtu i emisja pseudopodiów – forma 1; mikroskop optyczny z kontrastem fazowym i obiektywem immersyjnym ( $\times 100/1.25$ ).



Rys. 23. Adhezja płytek do powierzchni szkła: późna postać, płytka rozłożona, przylegająca do szkła, całkowicie rozpostarta – forma 2; mikroskop optyczny z kontrastem fazowym i obiektywem immersyjnym ( $\times 100/1.25$ ).

Dlatego jednocześnie z pomiarami spektroskopowymi dokonywane były czasowe obserwacje aktywacji na szkłe w obrazie mikroskopowym określające etapy adhezji płytek z wykorzystaniem mikroskopu optycznego z kontrastem fazowym i obiektywem immersyjnym ( $\times 100/1.25$ ). Produkt bogatopłytkowy był w tym celu umieszczany na szkiełku mikroskopowym i dla każdego z badanych preparatów wykonywano serię zdjęć o znanym czasie, jaki upłynął od momentu umieszczenia kropli PRP na szkiełku mikroskopowym oznaczonym jako czas  $t=0$  w celu rejestracji zmian w adhezji komórek dokonujących się wraz z upływem czasu. Na podstawie uzyskiwanych zdjęć dokonywana była klasyfikacja aktywowanych płytek do jednej z trzech grup: będącej we wczesnym fazie adhezji z charakterystycznymi wypustkami (pseudopodiami, Rys. 22), osiągające późny etap całkowitego rozpostarcia (*fully spread*) lub tworzące agregaty (Rys. 23), wyrażona jako procentowy udział danej formy zmienionego kształtu pośród wszystkich komórek przylegających w danym momencie.



Rys. 24. Zmiany kształtu komórek w czasie aktywacji powierzchniowej (zestawienie czasowe widm i zdjęć).

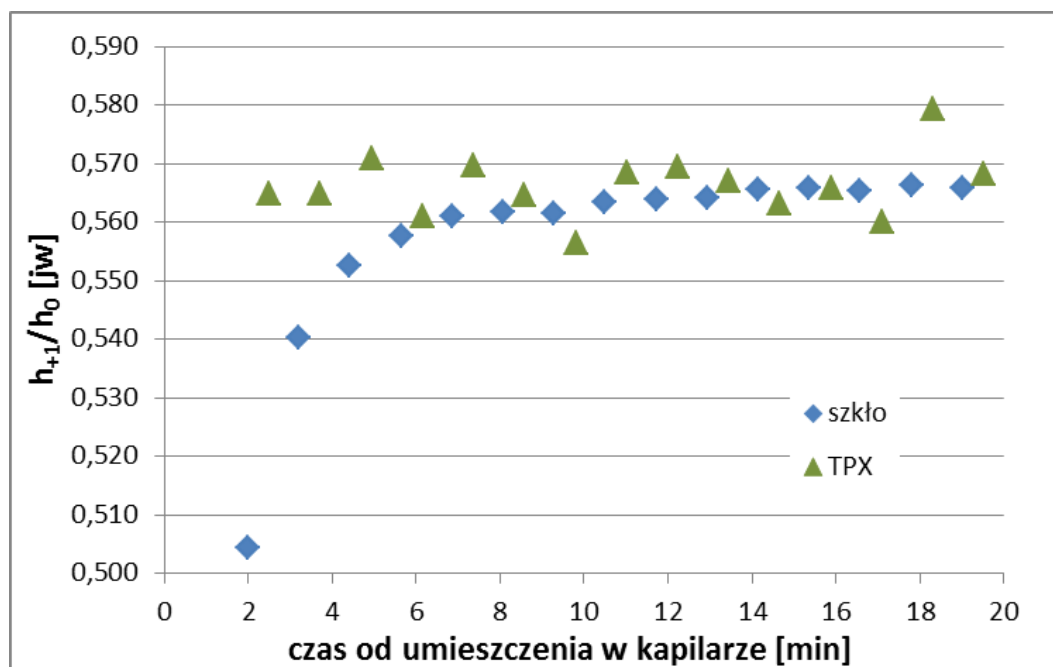
Obserwacje te potwierdziły, że zakres czasowy rejestracji widm EPR w przybliżeniu pokrywa się z czasem osiągnięcia przez płytki formy całkowicie rozpostartej w procesie adhezji na szkle, a tempo przylegania komórek odzwierciedla tempo wzrostu badanego parametru w krzywej kinetycznej (zestawienie czasowe widm i zdjęć, Rys. 24).

Dla potwierdzenia, że dokonywane obserwacje są związane z aktywacją powierzchniową płytek na szkle, a nie wynikają z zachodzenia innych procesów, przetestowano zachowanie stosunku  $h_{+1}/h_0$  dla płytek, które nie były aktywowane. Badanie stanu płytek na poziomie błonowym stanowiącym stan wyjściowy poprzedzający aktywację indukowaną szklaną powierzchnią przeprowadzono zastępując szklaną kapilarę kapilarą z tworzywa sztucznego TPX (polimetylopentenu, PMP), która w założeniu nie aktywuje komórek. Ten termoplastyczny, niepolarny polimer zgodnie z informacjami producenta (MITSUI CHEMICALS) jest stosowany w opakowaniach przepuszczających powietrze, wyposażeniu medycznym i laboratoryjnym, elementach mikrofalowych, kuchennych. Charakteryzuje się gęstością  $0,84 \text{ g/cm}^3$ , przezroczystością, wysoką przepuszczalnością gazów, odpornością chemiczną, niską absorpcją wilgoci, małym napięciem powierzchniowym wynoszącym  $24 \text{ mN/m}$ , współczynnikiem załamania  $1,460 \pm 0,005$  dla fali od światła widzialnego do  $100 \text{ GHz}$ , o własnościach dielektrycznych stałej  $\epsilon = 2,1$  i współczynnikiem dyssypacji  $\text{tg } \delta = 0,0008$  (przy  $12 \text{ GHz}$ ) pozwalających na zastosowanie w polach o wysokiej częstotliwości. Przygotowanie próbek i rejestracji dokonywano analogicznie do procedury w kapilarach szklanych.

Otrzymane widma wykazały odmienny przebieg procesów zachodzących w kapilarach z różnych materiałów (Rys. 25), a losowe zmiany badanego parametru w czasie od momentu umieszczenia komórek w kapilarze z TPX zdają się potwierdzać związek monitorowanych zmian płynności z aktywacją wywołaną kontaktem ze szkłem, wskazując na szkło jako czynnik aktywujący komórki będące odpowiedzialne za kształt uzyskanych za pomocą spektroskopii EPR kinetyk. Duży rozrzut wartości w kapilarze TPX można wytłumaczyć dużo gorszą jakością widm wynikającą z badaniem zdecydowanie mniejszej objętości próbki ze względu na wymiary tej kapilary, co przekłada się na rejestrację słabszego sygnału i występowanie większego szumu w widmach. Pojawiały się pomiary, które wykazywały pewną tendencję wzrostu płynności błony płytek także w kapilarze TPX. Uzasadnieniem tych spostrzeżeń może być wstępna aktywacja płytek dokonana w czasie przygotowywania próbek. Należy wziąć pod uwagę, że polimer, z którego wykonana jest wspomniana kapilara, nie jest materiałem



całkowicie obojętnym dla płytek krwi, w związku z tym nie można całkowicie wykluczyć wywołania ich aktywacji.



Rys. 25. Zestawienie kinetyk parametru  $h_{+1}/h_0$  wyznaczonego z widm znacznika 16-DSA uzyskanych za pomocą kapilary szklanej i kapilary z tworzywa sztucznego TPX.

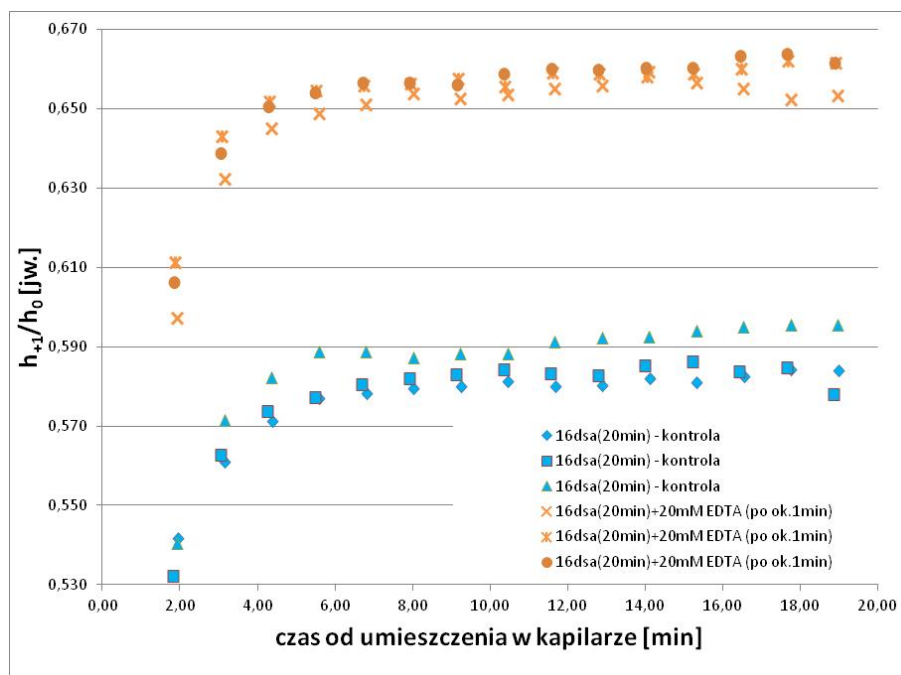
#### 4.5.5. Weryfikacja metody. Badanie płytek o zmienionym stanie aktywności

Prezentowaną metodę poddano weryfikacji pod kątem zdolności wykazania różnych stanów funkcjonalnych płytek krwi. Zadanie to realizowane było poprzez modyfikację stopnia aktywacji przeprowadzane na materiale bogatopłytkowym uzyskanym z ubogoleukocytarnych koncentratów płytkowych.

Zablokowanie funkcji płytek w znaczącym stopniu możliwe jest poprzez zastosowanie antykoagulantu takiego jak wersenian disodowy (EDTA). EDTA chelatuje dwudodatnie jony zapobiegając tworzeniu skrzepu, dlatego ma zastosowanie jako antykoagulant [145]. Wpływa to na procesy płytkowe zależne od wapnia takie jak kurczenie aktomiozyny, aktywacja aktomiozynowej ATPazy, glikogenolizy, aktywności fosfolipazy czy fosforylacji białek. Z drugiej strony istotny w procesie adhezji płytek do szkła fibrynogen i jego receptor wymaga wapnia do aktywacji. Pokazano, że zastosowanie czynników chelatujących jony wapnia powoduje znaczące obniżenie przylegania płytek krwi, ale nie ich całkowite zahamowanie. Jednocześnie obserwowano różnice w morfologii przylegających komórek związane z brakiem wapnia, które zachowały normalny kształt z okazjonalnymi pseudopodiami („sferyczne kolczaste”) i posiadały typowy losowy rozkład organelli jak w stanie spoczynku, zachowujące

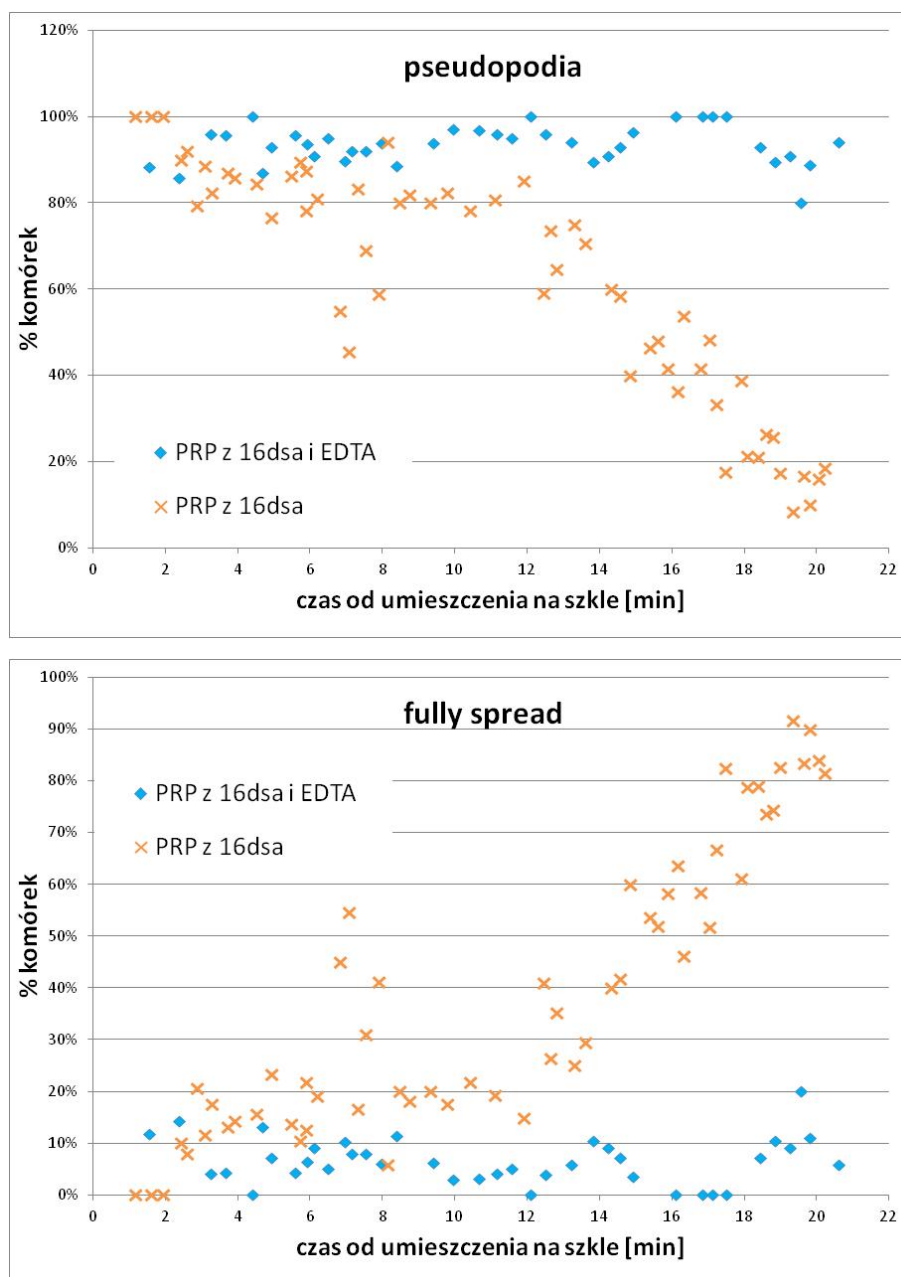
jednak możliwość adhezji w postaci całkowitego rozprzestrzeniania zachodzącej po wzbogaceniu środowiska jonami wapniowymi. Sugeruje się, że zmniejszenie adhezji przy braku jonów wapnia może wynikać z odzepiania płytek z powierzchni, wskazując na wzmacniające wiązania działanie wapnia lub jego niezbędny udział w etapie rozprzestrzeniania poprzez wpływ na większą deformowalność płytek [143]. Okazuje się, że EDTA działa uszkadzająco na płytki, powodując konwersję OSC w wydłużone segmenty, utratę zdolności agregacyjnych i adhezyjnych do szkła, dysocjację receptora GPIIb/IIIa, ale nie wpływa na zdolność obkurczania skrzepu [144, 145]. Zastosowanie wewnątrzkomórkowego czynnika chelatującego jony wapnia (np. Quin II) zapobiega wzrostowi poziomu wapnia związanego z powierzchnią lub w roztworze, hamując tworzenie sieci lamelopodium i nowych filamentów aktynowych, ale nieanormalnych wiązek aktynowych wypełniających pseudopodia, które na powierzchni szklanej tworzą jedno lub kilka pseudopodiów formujących pętle zawracające w kierunku komórki [146].

Procedura ograniczenia zdolności do aktywacji płytek dzięki działaniu EDTA została wykorzystana do przetestowania możliwości zastosowania metody pomiaru kinetyki widm EPR w szklanej kapilarze do oceny aktywności płytek. Różny stopień hamowania aktywacji osiągnięto poprzez wprowadzenie antykoagulantu w różnym stężeniu, a pomiary te wsparto obserwacjami mikroskopowymi zdolności adhezyjnych płytek na szkiełku mikroskopowym.



Rys. 26. Zestawienie kinetyk parametru  $h_{+1}/h_0$  wyznaczonego z widm znacznika 16-DSA uzyskanych dla produktu bogatopłytkowego i produktu bogatopłytkowego z dodatkiem EDTA.

Pomiary wykazały, że po zastosowaniu EDTA w największym stężeniu stan równowagi kinetyk zarejestrowanych spektrometrem EPR przejawiał dużo wyższą wartość niż przy braku antykoagulantu i zmniejszała się wraz z coraz mniejszymi stężeniami EDTA w materiale bogatopłytkowym, co wskazuje na wzrost płynności błony plazmatycznej płytek z rosnącą zawartością EDTA i oznacza mniejszą aktywację (Rys. 26). Jak pokazały obrazy mikroskopowe, w największym zastosowanym stężeniu EDTA obserwowana była ograniczona adhezja, w której przeważała forma z pseudopodiami i podobnie ze spadkiem koncentracji antykoagulantu płytki przejawiały zwiększone zdolności do rozprzestrzeniania się (Rys. 27).



Rys. 27. Zestawienie zmian przybieranych kształtów przez płytki w kontakcie ze szkłem obserwowane pod mikroskopem (odsetek komórek w formie z pseudopodiami – rysunek wyżej i w postaci całkowicie rozpostartej – rysunek niżej) dla produktu bogatopłytkowego i produktu bogatopłytkowego z dodatkiem EDTA.

Aktywacja wywołana wskutek kontaktu z powierzchnią jest procesem, który różni się od aktywacji wywołanej przez agonistów polegającej na wygenerowaniu szlaków sygnałowych zapoczątkowanych wiązaniem ligandów z receptorami błonowymi.

#### **4.6. Metody statystyczne wykorzystane do analizy wyników badań**

Opisany w rozdziale 3 cel badań implikuje, w ujęciu statystycznym, następujące zadania:

- zbadanie jednorodności zbiorowości przebadanych zwierząt (owiec) w zakresie grupy kontrolnej oraz grupy poddanej ekspozycji NIR;
- ocena istotności wpływu NIR na parametry krwi, które były zbierane podczas prowadzenia badań;
- statystyczna ocena wpływu liczby powtórzeń dializ oraz poszczególnych prób podczas prowadzenia dializy na zróżnicowanie badanych parametrów;
- jakościowa ocena wpływu (stymulująca, destymulująca) predyktorów jakościowych (NIR, nr dializy, nr próbki w ramach danej dializy) na parametry krwi, co do których mamy potwierdzone statystycznie istotne zróżnicowanie w trakcie badań.

Z uwagi na przyjęty cel badań cała analiza statystyczna polegać będzie na ocenie istotności wpływu wybranych promieniowania NIR, nr dializy oraz punktu pomiarowego w ramach danej dializy na określone parametry krwi. Z uwagi na fakt, że w doświadczeniach obiektami badań są zwierzęta (obiekty generalnie dosyć zróżnicowane) należy w pierwszej kolejności przeprowadzić weryfikację jednorodności zbiorowości w ramach badanych grup (kontrola – NIR). Do tego celu wykorzystano niehierarchiczną metodę dyskryminacji – analizę skupień. Podstawową ideą tej metody jest rozdzielnie obiektów do pewnej liczby grup „podobnych” do siebie obiektów, które z drugiej strony nie są „podobne” do obiektów z pozostałych grup. Tego typu grupowanie może, w przypadku badań na różnych (z punktu widzenia biologicznego) osobnikach, wnieść wiele w poznanie struktury populacji. Można tutaj:

- dokonać redukcji olbrzymiego zbioru danych wejściowych do średnich poszczególnych grup;
- potraktować rozdzielnie zmiennych na grupy jako wstęp do dalszych wielowymiarowych analiz.

Metodę analizy skupień stosujemy wówczas, gdy nie dysponujemy (na początku) żadnymi hipotezami a priori, a zarazem jesteśmy w fazie eksploracyjnej naszych badań. Stąd

na tym etapie testowanie statystycznej istotności (poziom współczynnika istotności p) nie ma tutaj zastosowania. W przypadku naszych badań do oceny „niepodobieństwa” obiektów wykorzystano odległość Euklidesową jako miarę:

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^p (x_i - y_i)^2}, \quad (1)$$

gdzie:  $x = (x_1, \dots, x_p)$ ;  $y = (y_1, \dots, y_p)$ .

Dwa obiekty są tym bardziej niepodobne, im większa jest odległość między nimi. Stąd w skupieniu łączy się obiekty leżące blisko siebie, a daleko od innych, tworzących inne skupienie [118].

Po wykonanej analizie skupień i wyodrębnieniu grup podobnych (ewentualnie odrzuceniu skrajnie odległych) poddano ocenie wpływ czynników predykcyjnych na wybrane parametry krwi z wykorzystaniem jednoczynnikowej, wieloczynnikowej i wielowymiarowej analizy wariancji (ANOVA, MANOVA). We wszystkich przeprowadzonych analizach, podobnie jak w analizie wariancji dla klasyfikacji pojedynczej, bada się wpływ czynnika klasyfikującego (predyktora jakościowego kontrolowanego na wielu poziomach) na wyniki zrealizowanego badania. Inaczej mówiąc dla każdej badanej cechy należy zweryfikować hipotezę, że średnie w grupach są jednakowe:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k \quad (2)$$

wobec hipotezy alternatywnej:

$$H_1: \text{co najmniej dwie średnie różnią się między sobą} \quad (3)$$

Parametryczna analiza wariancji musi być poprzedzona zweryfikowaniem podstawowych założeń:

- analizowana zmienna musi być mierzalna;
- rozważanych  $k$  niezależnych populacji ma rozkłady normalne  $N(\mu_i, \sigma_i)$ ,  
 $i = 1, 2, \dots, k$ ;
- rozkłady te mają jednakową wariancję,  $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 = \sigma^2$ .

Niespełnienie ww. warunków podważa wiarygodność wyników uzyskanych z parametrycznej analizy wariancji. W przypadku złamania założenia o jednorodności wariancji użyteczna może się okazać wartość testu F z poprawką Welcha.

Model wielowymiarowej analizy wariancji (MANOVA) staje się optymalnym wyborem, gdy mierzalne zmienne objaśniane (tutaj wybrane parametry krwi) traktowane są jako powiązane ze sobą, a tym samym tworzą one strukturę relacyjną cech, którą sensownie –

w całości lub w części – da się interpretować merytorycznie. Implikuje to potrzebę wyłonienia (ewentualnie) ich podzbioru możliwie najsilniej różnicującego analizowane populacje niezależne (wskazane przez poziomy zmiennych objaśniających – tutaj: K/NIR, nr dializy, nr próbki w dializie) oraz określenia wkładu każdej ze zmiennych w dyskryminacji między populacjami. Wspomniane aspekty określić można, odpowiednio jako problem selekcji zmiennych i problem ich uporządkowania [42].

Analizę wyników badań przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu statystycznego *Statistica* firmy Tibco v. 13.3. W każdym przeprowadzonym testowaniu określono progową wartość poziomu istotności  $p=0,05$ .

## 5. Wyniki badań

### 5.1. Ocena wyników uzyskanych badań z wykorzystaniem analizy skupień

Na początku analizy przeprowadzono niehierarchiczną metodę dyskryminacji – uogólnioną analizę skupień dla całej badanej zbiorowości (badanych zwierząt - *sheep*) z podziałem na dwa rozłączne podzbiory. Jakość tego podziału decyduje o jednorodności badanych grup. Wyniki klasyfikacji przedstawiono w Tab. 3 i Tab. 4.

Tab. 3. Wyniki uogólnionej analizy skupień dla grupy kontrolnej (K).

próbka=K Tabela licznosci dla zmiennej jakościowej: sheep (Arkusz in Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2 Całkowita liczba przypadków uczących: 319			
	Skupienie 1	Skupienie 2	Razem
1	45	0	45
2	35	5	40
4	32	15	47
6	1	44	45
7	0	50	50
9	3	46	49
12	26	17	43

Tab. 4. Wyniki uogólnionej analizy skupień dla grupy NIR.

próbka=NIR Tabela licznosci dla zmiennej jakościowej: sheep (Arkusz in Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2 Całkowita liczba przypadków uczących: 234			
	Skupienie 1	Skupienie 2	Razem
3	48	0	48
5	0	47	47
8	49	0	49
10	46	0	46
11	44	0	44

W Tab. 3 wyraźnie widać mało precyzyjne sklasyfikowanie dwóch obiektów 4 i 12, natomiast w Tab. 4 widzimy wyraźne rozgraniczenie obiektu 5 od pozostałych. O stopniu ważności naszej klasyfikacji (jakości klasyfikacji) decyduje wynik testu niezależności, który odpowiednio dla K i NIR przedstawiono w Tab. 5 i Tab. 6. Bardzo niski poziom istotności p wskazuje na wysoką istotność naszej klasyfikacji w obrębie obydwu analizowanych grup.

Tab. 5. Wyniki testu niezależności klasyfikowanych skupień dla grupy kontrolnej (K).

próbka=K Testy niezależności dla zmiennych jakościowych (Arkusz in Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2 Całkowita liczba przypadków uczących: 319					
	df	Chi-kwadrat	Wartość p	G-kwadrat	Wartość p
sheep	6	202,959	0,000000	259,498	0,000000

Tab. 6. Wyniki testu niezależności klasyfikowanych skupień dla grupy NIR.

próbka=NIR Testy niezależności dla zmiennych jakościowych (Arkusz in Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2 Całkowita liczba przypadków uczących: 234					
	df	Chi-kwadrat	Wartość p	G-kwadrat	Wartość p
sheep	4	234,000	0,000000	234,742	0,000000

Wynik wstępnej klasyfikacji obiektów wskazuje na możliwość eliminowania obiektów zarówno w grupie kontrolnej (K) jak i grupie NIR. W kolejnym kroku podejmowano różne możliwości eliminacji obiektów i za każdym razem weryfikowano jednorodność. Okazało się, że najbardziej drastyczny wariant – eliminacja obiektów 4, 5 i 12 – dała zadowalający efekt. Wyniki klasyfikacji całej zbiorowości na dwa rozłączne zbiory są 100% (Tab. 7).

Tab. 7. Wyniki uogólnionej analizy skupień dla całej zbiorowości po odjęciu owiec 4, 5 i 12.

Tabela licznosci dla zmiennej jakościowej: próbka (Data_NK_Del w Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2 Całkowita liczba przypadków uczących: 416			
	Skupienie 1	Skupienie 2	Razem
K	229	0	229
NIR	0	187	187

Wyniki testowania statystycznie istotnej niezależności skupień oraz standaryzowaną odległość między skupieniami przedstawiono odpowiednio w Tab. 8 i Tab. 9.

Tab. 8. Wyniki testu niezależności klasyfikowanych skupień dla badanej zbiorowości statystycznej po odjęciu owiec 4, 5, 12.

Testy niezależności dla zmiennych jakościowych (Data_NK_Del w Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2 Całkowita liczba przypadków uczących: 416					
	df	Chi-kwadrat	Wartość p	G-kwadrat	Wartość p
próbka	1	416,000	0,000000	572,451	0,000000

Tab. 9. Standaryzowana odległość między skupieniami (domyślnie skupienie 1 – K, skupienie 2 – NIR).

Standaryzowana odległość między centroidami k-średnich (Data_NK_Del w Analysis_non_kidneys.stw) Liczba skupień: 2		
	Skupienie 1	Skupienie 2
Skupienie 1	0,00000	1,11147
Skupienie 2	1,11147	0,00000



## 5.2. Analiza zmian zachodzących podczas trwania hemodializy uwzględniająca miejsce i czas pobrania krwi na podstawie wyników wszystkich dializ (10 zabiegów) i bez rozróżnienia na grupę kontrolną i naświetlaną

Dla oceny zmian badanych parametrów podczas trwania zabiegu hemodializy przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji w odniesieniu do poszczególnych punktów w dializie (metodyka - punkty pomiarowe 2-6, z dializy na dializę) bez podziału na grupy.

Na początku zweryfikowano założenia testu ANOVA. Na podstawie wykonanych wykresów prawdopodobieństwa nie stwierdzono odstępstw od normalności rozkładów dla poszczególnych zmiennych. Przeprowadzony test Levene'a do analizy jednorodności wariancji w grupach okazał się istotny statystycznie w przypadku ADP, co daje podstawy do odrzucenia tej hipotezy. Ze względu na nieznaczne niespełnienie założenia dla jednej zmiennej przeprowadzona została analiza z poprawką Welcha. Wykresy normalności oraz wyniki testu Levene'a zamieszczono w **Załączniku 1**.

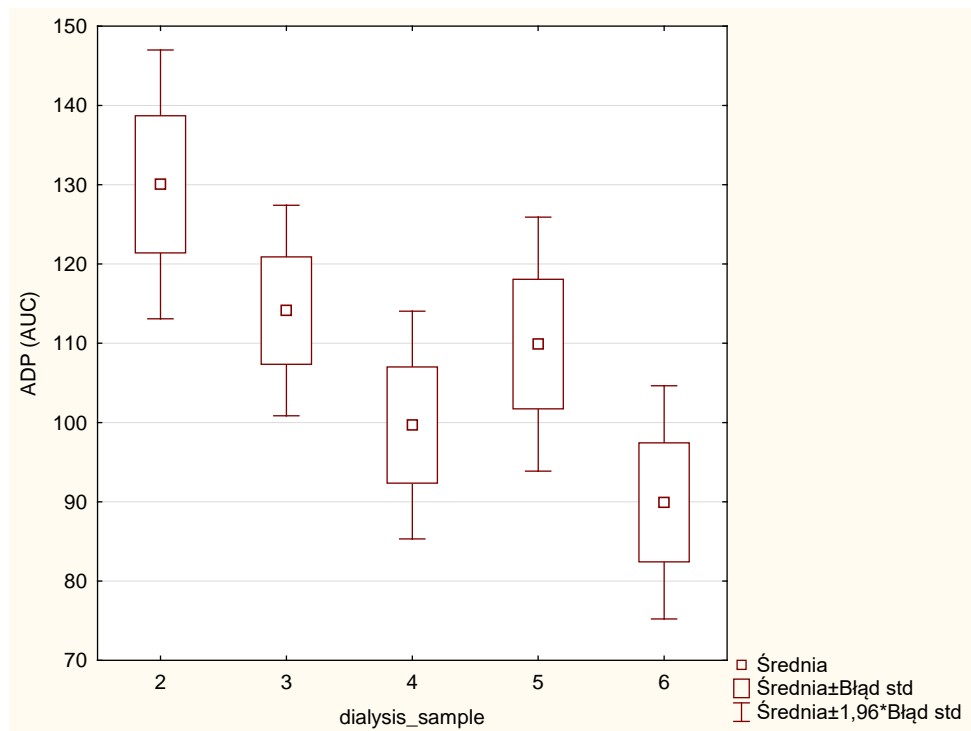
Analiza wykazała statystycznie istotne zróżnicowanie w obrębie pojedynczego zabiegu dla zmiennej ADP (AUC) oraz EPR-nas, przy czym badany parametr związany z płynnością cechuje się zdecydowanie większą zmiennością (czterokrotnie większa wartość testu F, Tab. 10).

Tab. 10. Wyniki jednoczynnikowej ANOVA z poprawką Welcha. Czynniki: punkty pomiarowe podczas dializy.

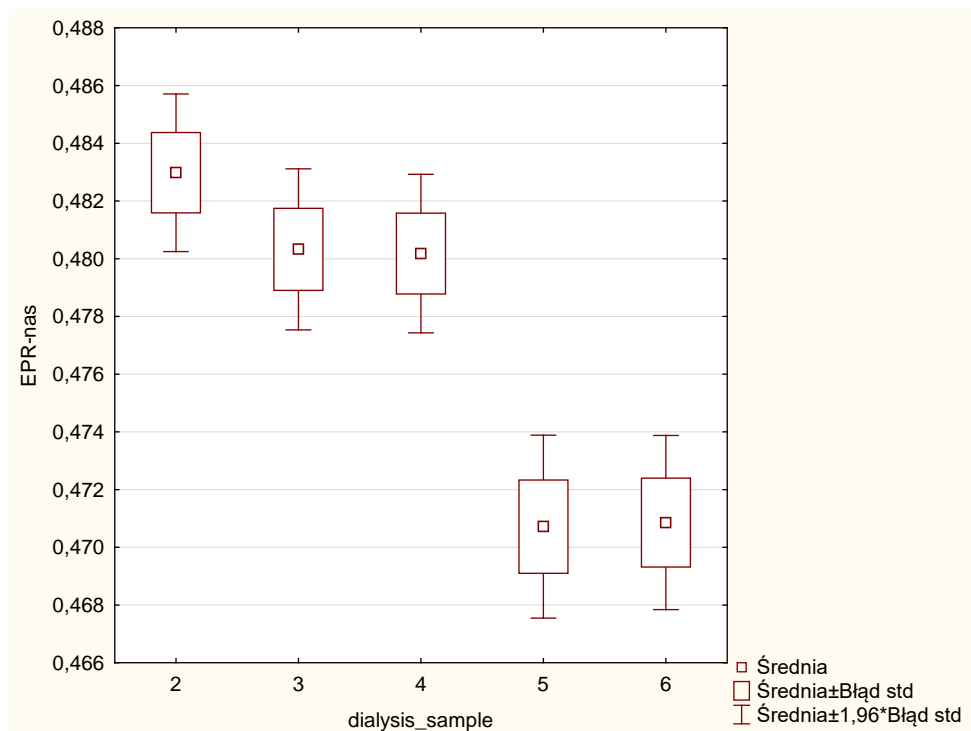
Variable	Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$			
	Welch df Efekt	Welch df Błąd	Welch F	Welch p
koll (AUC)	4	292,455	0,438	0,780781
ADP (AUC)	4	<b>291,976</b>	<b>3,588</b>	<b>0,007114</b>
EPR-czas	4	291,772	0,768	0,546648
EPR-nas	4	<b>292,264</b>	<b>14,714</b>	<b>0,000000</b>

Analiza pokazuje postępujące z czasem dializy osłabienie odpowiedzi płytek na stymulację ADP, na co wskazują istotnie statystycznie niższe wartości (odpowiednio o ok. 25% i 30%) po 15min krążenia i ostatniej w porównaniu do pierwszej (przed dializatorem) pobranej próbki krwi. Można zauważyć także potęgujący to zjawisko efekt (Rys. 28) przejścia krwi przez dializator, (choć wyniki testów post-hoc pomiędzy próbkami nie wykazały istotnie statystycznego zróżnicowania). Wyznaczany spektroskopowo parametr płynności błony płytek pokazuje różnice pomiędzy początkowymi i końcowymi punktami analiz (Rys. 29). Pod koniec

dializy (próbki 5 i 6) ten parametr podobnie ulega wyraźnemu zmniejszeniu w stosunku do początkowego etapu zabiegu (istotnie statystycznie niższe w odniesieniu do punktów 2, 3 i 4), co wskazuje na zmniejszenie płynności błony płytek wywołaną procedurą hemodializy.



Rys. 28. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie.



Rys. 29. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie.

Oznacza tym samym postępującą aktywacją komórek, która może skutkować pogorszeniem własności agregacyjnych. Wpływ przejścia komórek przez dializator na płynność ich błony jest prawdopodobnie większy na początku zabiegu, choć wyniki testów post-hoc pomiędzy początkowymi punktami (2, 3, 4) i dwoma końcowymi (4, 5) nie pokazały zróżnicowania statystycznie istotnego.

Mimo braku istotności w zróżnicowaniu odpowiedzi na stymulację kolagenem uzyskane wyniki pozwalają na wstępną konkluzję, że w czasie hemodializy początkowo, po pierwszym przejściu przez dializator, płytki stają się bardziej podatne na agonistę i w dalszym przebiegu procesu stopniowo coraz słabiej odpowiadają na jego obecność. Zmienność parametru czasu związanego z osiągnięciem równowagowego stanu płynności błony wykazuje tendencję spadkową w trakcie procedury dializy. Przedstawiona analiza stanowi w dużym uproszczeniu przybliżenie obrazu wpływu hemodializy na płytki krwi i wskazuje na pogorszenie ich funkcji wywołane zabiegiem. Poniżej (Tab. 11 i Tab. 12) przedstawiono wyniki testów post-hoc (pomiędzy grupami) dla zmiennych, które w sposób statystycznie istotny są zróżnicowane pomiędzy analizami. Wszystkie wykresy box-plot zamieszczono w **Załączniku 1**.

Tab. 11. Wyniki testu post-hoc Tukeya dla zmiennej ADP (AUC). Czynniki: punkty pomiarowe podczas dializy.

dialysis_sample	Tukey HSD test; Zmienna: ADP (AUC). Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$				
	{1} M=130,04	{2} M=114,13	{3} M=99,686	{4} M=109,90	{5} M=89,932
2 {1}		0,589193	<b>0,042898</b>	0,346615	<b>0,002220</b>
3 {2}	0,589193		0,676309	0,995231	0,172940
4 {3}	<b>0,042898</b>	0,676309		0,882842	0,899196
5 {4}	0,346615	0,995231	0,882842		0,355930
6 {5}	<b>0,002220</b>	0,172940	0,899196	0,355930	

Tab. 12. Wyniki testu post-hoc Tukeya dla zmiennej EPR-nas. Czynniki: punkty pomiarowe podczas dializy.

dialysis_sample	Tukey HSD test; Zmienna: EPR-nas. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$				
	{1} M=,48298	{2} M=,48033	{3} M=,48018	{4} M=,47072	{5} M=,47086
2 {1}		0,709172	0,665063	<b>0,000017</b>	<b>0,000017</b>
3 {2}	0,709172		0,999994	<b>0,000057</b>	<b>0,000072</b>
4 {3}	0,665063	0,999994		<b>0,000073</b>	<b>0,000095</b>
5 {4}	<b>0,000017</b>	<b>0,000057</b>	<b>0,000073</b>		0,999995
6 {5}	<b>0,000017</b>	<b>0,000072</b>	<b>0,000095</b>	0,999995	

### 5.3. Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną występujących w trakcie pojedynczej dializy (zmiany w czasie) na podstawie wyników wszystkich 10 zabiegów z uwzględnieniem miejsca pobrania krwi, oddzielnie przed (B) i za (A) dializatorem.

Po uzyskaniu istotnych różnic dla wybranych parametrów w poszczególnych punktach pomiarowych zdecydowano się dalej na bardziej szczegółową analizę. W tym celu wykorzystano dwuczynnikową ANOVA z uwzględnieniem K/NIR (czynniki 1) dla przekrojów wzdłuż dializ (punkty pomiarowe 2-6, czynnik 2) z podziałem na grupy przed (B) i za (A) dializatorem. Przeprowadzona analiza wyników metody EPR i agregometrycznej miała na celu wskazanie zmian parametrów podczas pojedynczej procedury hemodializy oraz różnic między grupą kontrolną i naświetlaną na podstawie próbek pobranych przed (B) i za (A) dializatorem (Tab. 13 i Tab. 14). Wyniki testów jednorodności wariancji, testów post-hoc oraz wykresów box-plot dla poszczególnych zmiennych zestawiono w **Załączniku 2**.

Tab. 13. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA **przed dializatorem**. Czynniki: K/NIR; punkty pomiarowe podczas dializy.

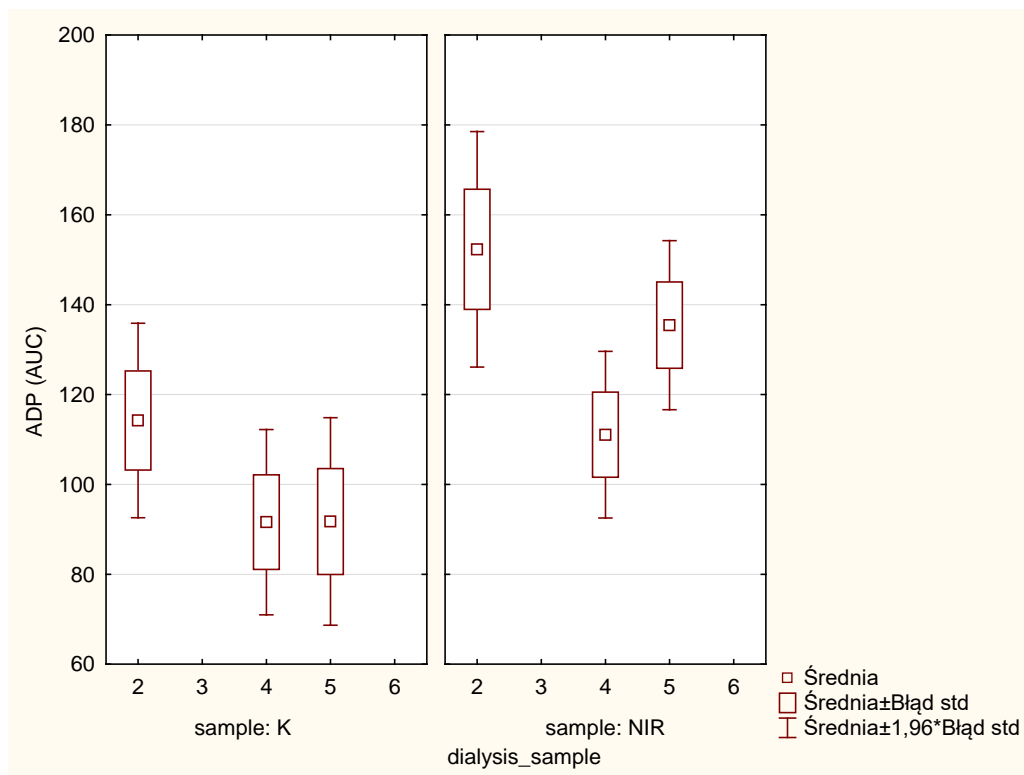
Zmienna	B/A=B Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
koll (AUC)	6854,2	5	1370,844	765309	348	2199,164	0,623	0,682076
ADP (AUC)	<b>163442,4</b>	<b>5</b>	<b>32688,472</b>	<b>2589212</b>	<b>348</b>	<b>7440,264</b>	<b>4,393</b>	<b>0,000683</b>
EPR-czas	0,7	5	0,146	155	348	0,446	0,327	0,896398
EPR-nas	<b>0,0</b>	<b>5</b>	<b>0,002</b>	<b>0</b>	<b>348</b>	<b>0,000</b>	<b>8,167</b>	<b>0,000000</b>

Tab. 14. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA **za dializatorem**. Czynniki: K/NIR; punkty pomiarowe podczas dializy.

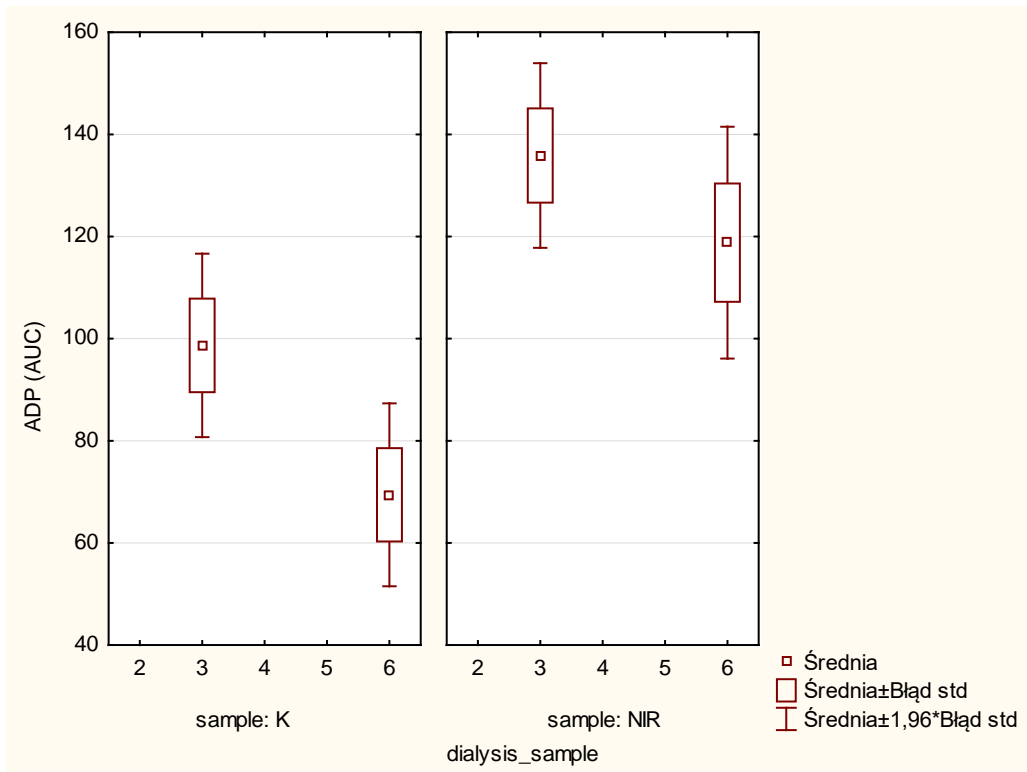
Zmienna	B/A=A Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
koll (AUC)	<b>28277,3</b>	<b>3</b>	<b>9425,752</b>	<b>477527</b>	<b>232</b>	<b>2058,307</b>	<b>4,579</b>	<b>0,003891</b>
ADP (AUC)	<b>143968,4</b>	<b>3</b>	<b>47989,474</b>	<b>1301325</b>	<b>232</b>	<b>5609,159</b>	<b>8,556</b>	<b>0,000021</b>
EPR-czas	1,8	3	0,603	132	232	0,567	1,063	0,365613
EPR-nas	<b>0,0</b>	<b>3</b>	<b>0,002</b>	<b>0</b>	<b>232</b>	<b>0,000</b>	<b>6,945</b>	<b>0,000170</b>

W wyniku naświetlania, płytki krwi pobranej zarówno przed jak i po przejściu przez dializator silniej reagowały na agonistę ADP (nawet o ok. 40%) w porównaniu z grupą kontrolną (różnice istotne statystycznie). W obu grupach kontrolnej i naświetlanej ujawniła się słabsza odpowiedź na tego agonistę wraz z czasem trwania dializy, co reprezentują niższe

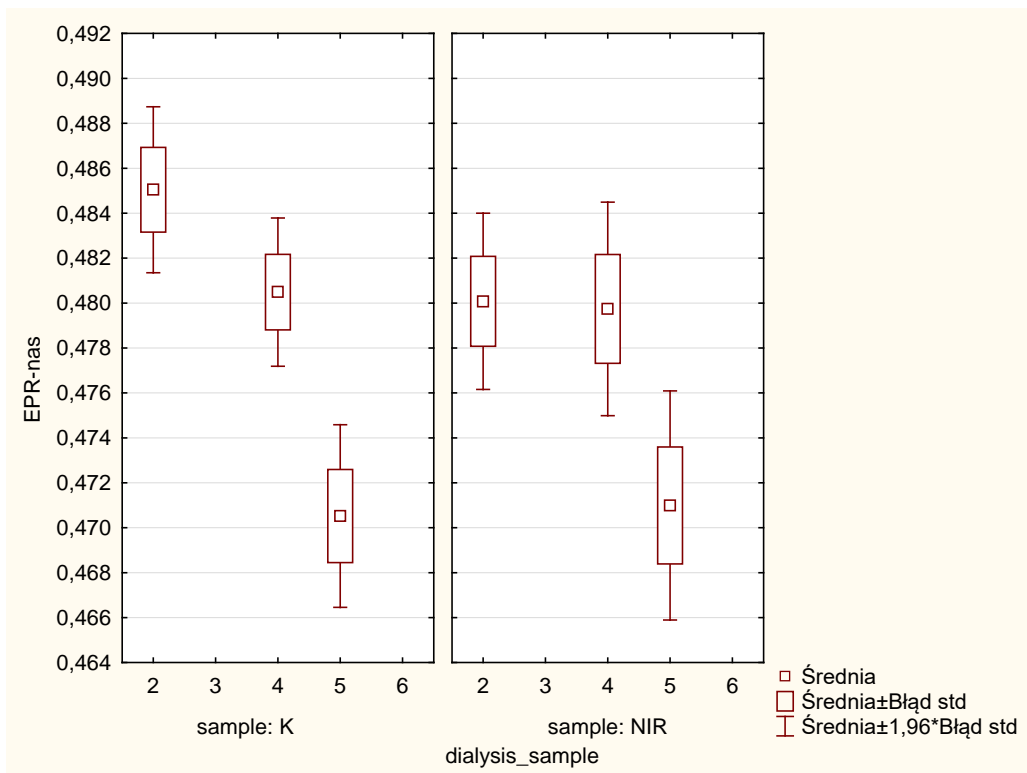
wartości w próbkach pobranych na koniec w porównaniu z początkowymi (Rys. 30 i Rys. 31). Malejąca tendencja ujawniła się zarówno w krwi pobranej przed dializatorem (B) jak i po przejściu przez niego (A). Podobny efekt w obu grupach występuje jako skutek przepływu krwi przez dializator, co można zaobserwować w postaci zmian zachodzących między próbkami 2 a 3 oraz 5 a 6. Wyniki wskazują na całkowicie odmienne zachowanie płytek naświetlanych w porównaniu z próbkami nienaświetlanymi. Porównanie reakcji na ADP próbek pobranych przed dializatorem w czasie trwania dializy wskazuje, że promieniowanie NIR wzmacnia zdolności agregacyjne płytek. Po ok. 15 min trwania dializy (próbka nr 4) w obu grupach nastąpiło osłabienie odpowiedzi płytek na ADP. W przeciwieństwie do płytek kontrolnych, których odpowiedź na agonistę była słabsza do końca trwania dializy, płytki naświetlane pod koniec procedury częściowo odzyskiwały zdolności agregacyjne (o ok. 20%).



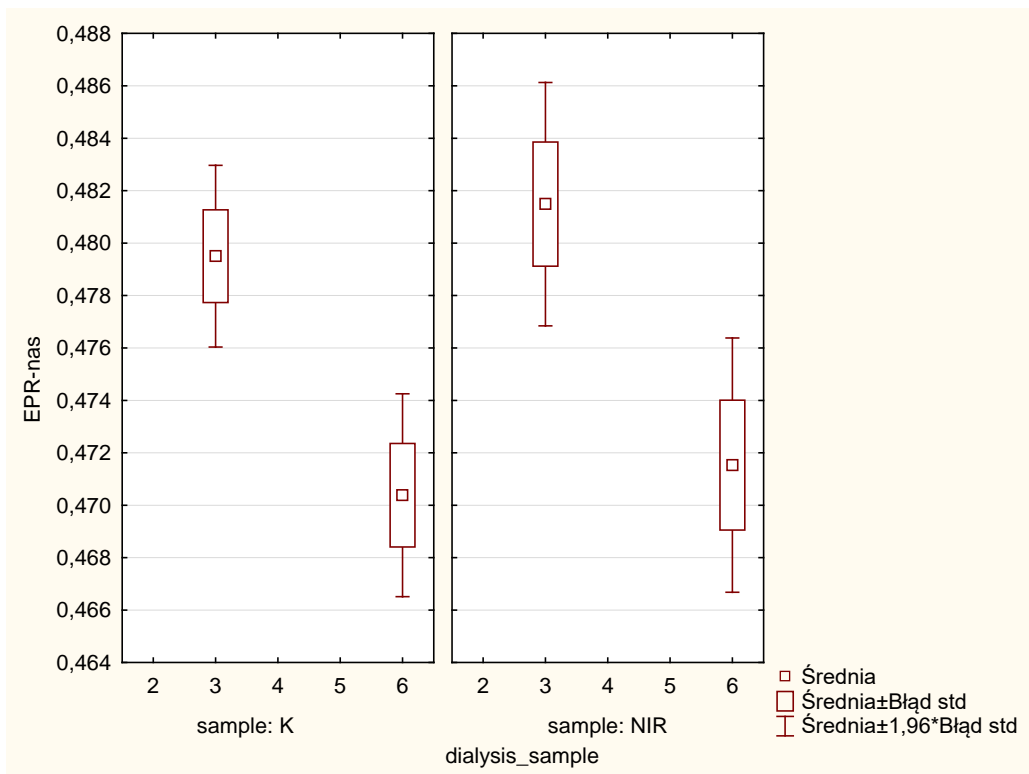
Rys. 30. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **przed dializatorem** (B).



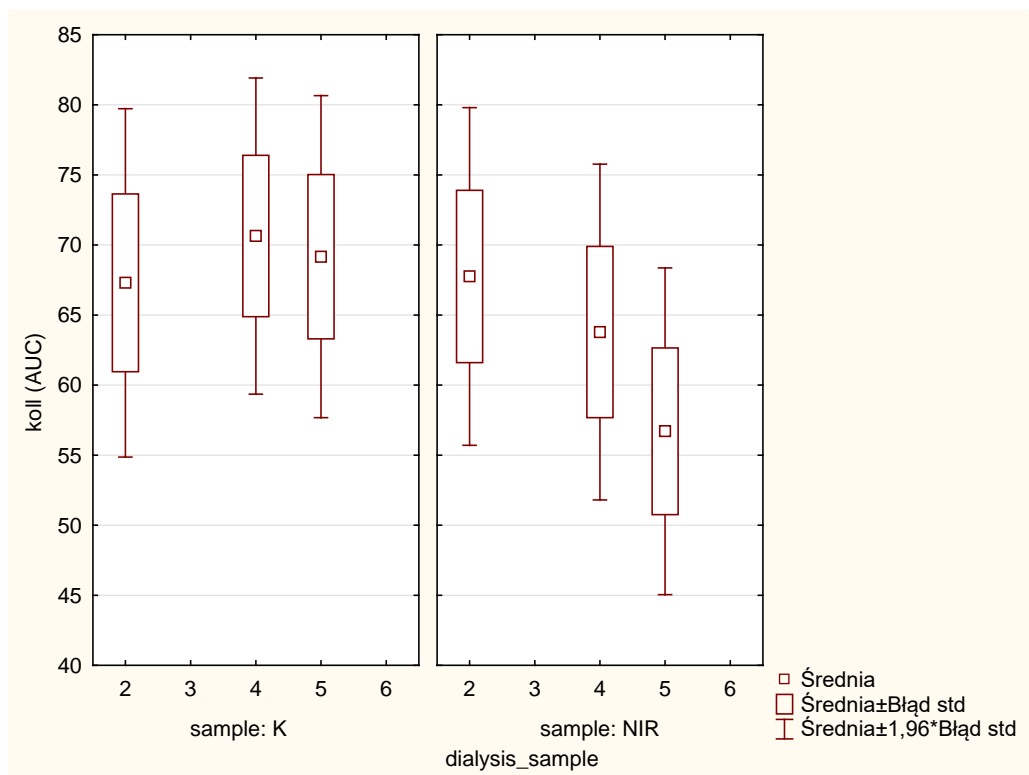
Rys. 31. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbkę pobrana **za dializatorem** (A).



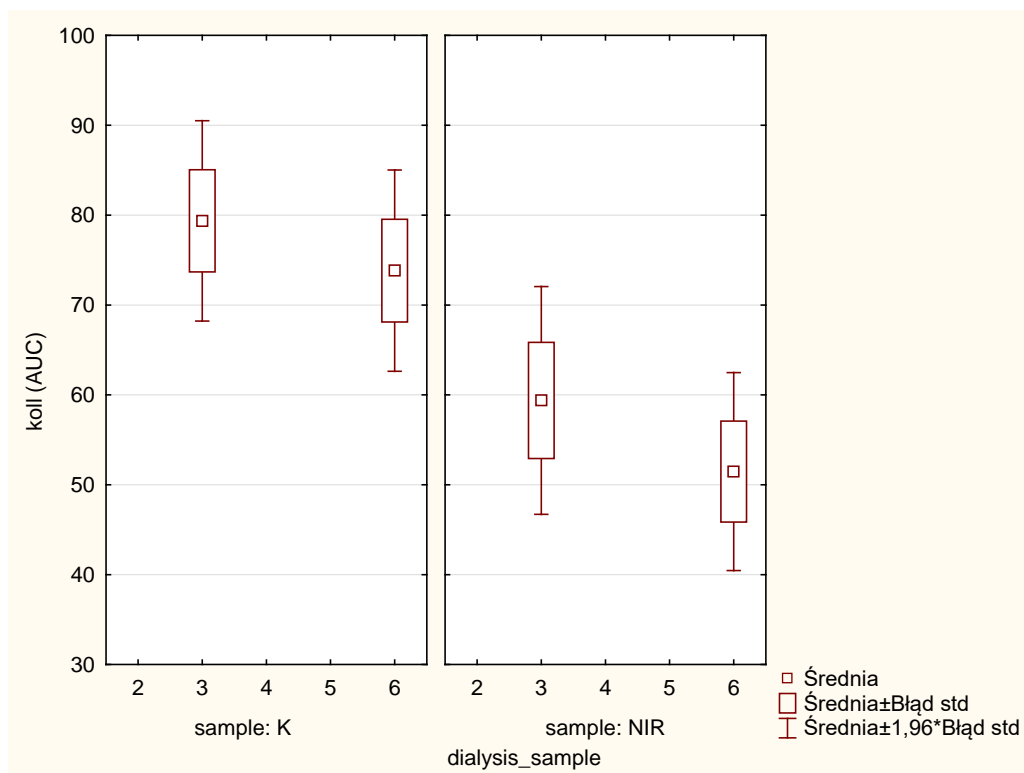
Rys. 32. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbkę pobrana **przed dializatorem** (B).



Rys. 33. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **za dializatorem** (B).



Rys. 34. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **przed dializatorem** (B).



Rys. 35. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbka pobrana **za dializatorem** (A).

Łączne oddziaływanie branych pod uwagę czynników, czyli uwzględnienie podziału na grupę kontrolną i naświetlaną oraz w zależności od miejsca pobrania krwi, wykazuje statystycznie istotny wpływ na różnicowanie się spektroskopowego parametru płynności błony. Płynność błony płytek kontrolnych oraz naświetlanych ulega zmniejszeniu wraz z czasem trwania dializy. Zmiany te demonstrują wyniki próbek pobranych zarówno przed jak i po przejściu przez dializator (Rys. 32 i Rys. 33; wszystkie różnice istotne statystycznie). Brak zmian tego parametru w pierwszych 15 min. dializy grupy naświetlanej być może świadczy o opóźnieniu deformujących skutków dializy na błonę, które następuje w efekcie działania promieniowania NIR. Wyniki parametru równowagowego płynności błony sugerują odmienne następstwa przejścia krwi przez dializator w grupie kontrolnej i naświetlanej na początku zabiegu: o ile w grupie kontrolnej wyniki sygnalizują jego zmniejszenie wraz z pierwszym przepływem przez dializator, to w grupie naświetlanej wskazują na odwrotną tendencję. Pod koniec dializy te efekty w obu grupach ulegają stłumieniu, na co wskazuje brak różnic między próbką 5 a 6. Analogicznie do rezultatów pobudzenia ADP wyniki odpowiedzi agregometrycznej na stymulację kolagenem w próbkach pobranych za dializatorem, które prezentują istotnie statystycznie zróżnicowanie, wskazują na jej osłabienie wraz z czasem dializy Rys. 35. Jednak w przeciwieństwie do tego pierwszego agonisty wartości dla grupy



kontrolnej okazały się wyższe od naświetlanej (o ok. 25%). W grupie naświetlanej tendencja malejąca widoczna jest także w próbkach pobieranych przed dializatorem (Rys. 34) i podobnie jako efekt przejścia przez dializator (porównanie odpowiednio próbek 2 z 3 i 5 z 6 pokazuje osłabienie jako rezultat kontaktu z membraną dializatora). Inaczej sytuacja rysuje się w grupie kontrolnej, gdzie mimo nieistotnych statystycznie różnic w próbkach przed dializatorem odpowiedź na stymulację kolagenem jest bardziej stabilna lub lekko wzmacniana wraz z czasem trwania dializy. Na podobne zmiany zdolności do pobudzenia tym agonistą wskazuje porównanie wyników przed i za dializatorem, obrazujące skutek przepływu przez dializator. Odmienne efekty wywołane tymi różnymi agonistami można tłumaczyć innymi szlakami i innym natężeniem pobudzenia, które dla kolagenu w zastosowanym stężeniu jest silniejsze niż dla ADP. Wyniki pozwalają przypuszczać, że podczas dializy płytki w grupie kontrolnej pobudzane silniejszym agonistą mogą ujawniać niepożądaną nadagregowalność, którą prawdopodobnie ekspozycja na promieniowanie NIR jest w stanie stłumić.

Parametr czasowy związany z płynnością błony ponownie nie wykazał istotnego statystycznie zróżnicowania. Analiza zmian tego parametru wskazuje jedynie na tendencję jego skracania w czasie dializy grupy kontrolnej i większego zróżnicowania w grupie naświetlanej.

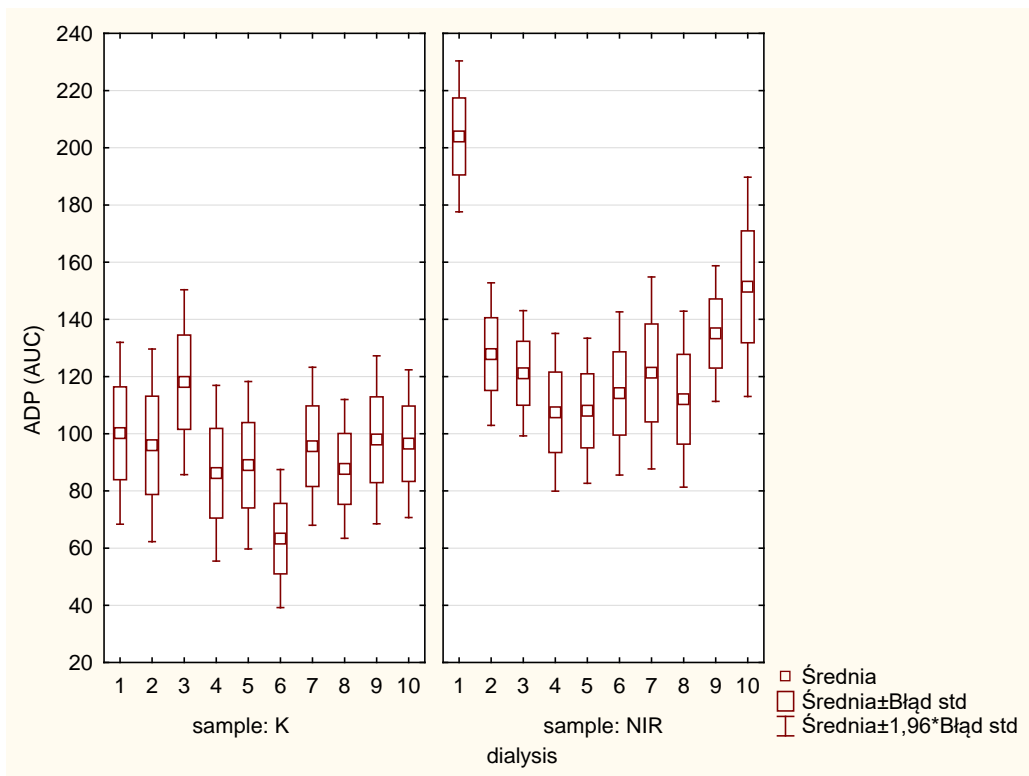
#### **5.4. Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną występujących w wraz z prowadzeniem kolejnych dializ (zmiany w czasie od 1. do 10. zabiegu) na podstawie wyników otrzymanych w poszczególnych sesjach niezależnie od czasu i miejsca pobrania krwi (łącznie przed (B) i za (A) dializatorem).**

Aby sprawdzić jakie zmiany zachodzą na przestrzeni poszczególnych dializ wykorzystano w niniejszej pracy dwuczynnikową ANOVA dla przekrojów wzdłuż dializ (czynnik 1) z uwzględnieniem K/NIR (czynnik 2). Z uwagi na brak jednorodności wariancji w trzech z czterech badanych grup (szczegółowe tabele w **Załączniku 3**) zastosowano do ANOVA poprawkę Welcha (Tab. 15).

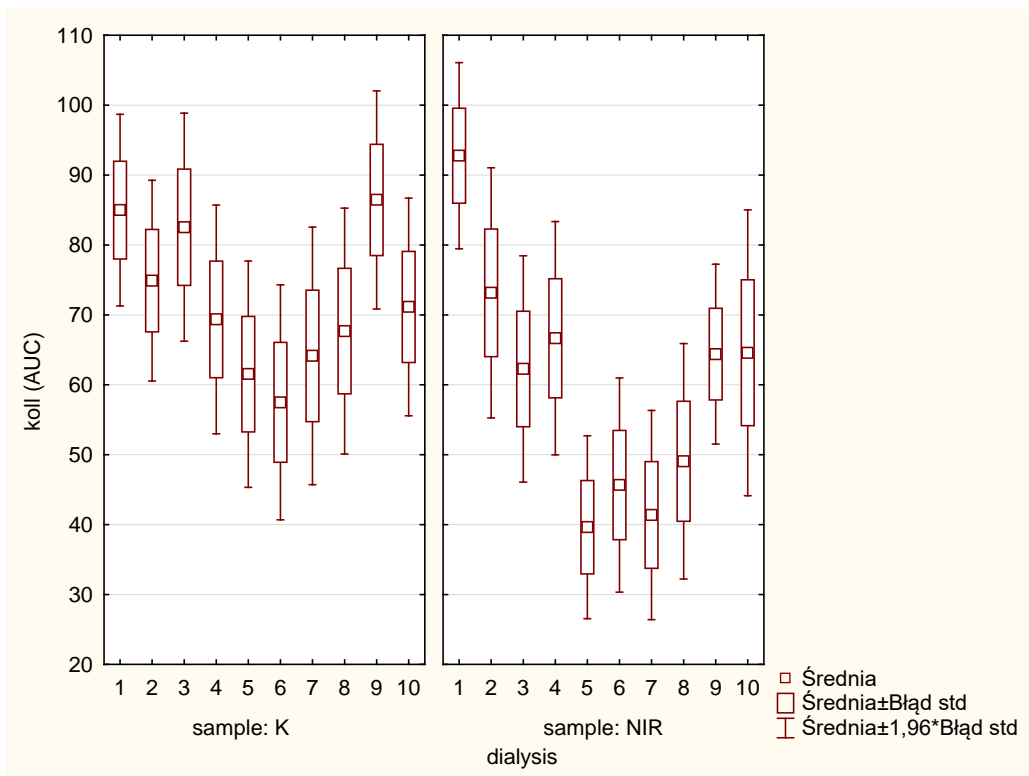
Tab. 15. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA z poprawką Welcha. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ.

Zmienna	Analiza wariancji z poprawką Welcha. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$			
	df Welch Efekt	df Welch Błąd	F Welcha	p Welcha
koll (AUC)	<b>19</b>	<b>202,813</b>	<b>3,701</b>	<b>0,000001</b>
ADP (AUC)	<b>19</b>	<b>202,855</b>	<b>4,311</b>	<b>0,000000</b>
EPR-czas	19	201,941	0,974	0,493589
EPR-nas	<b>19</b>	<b>201,936</b>	<b>6,359</b>	<b>0,000000</b>

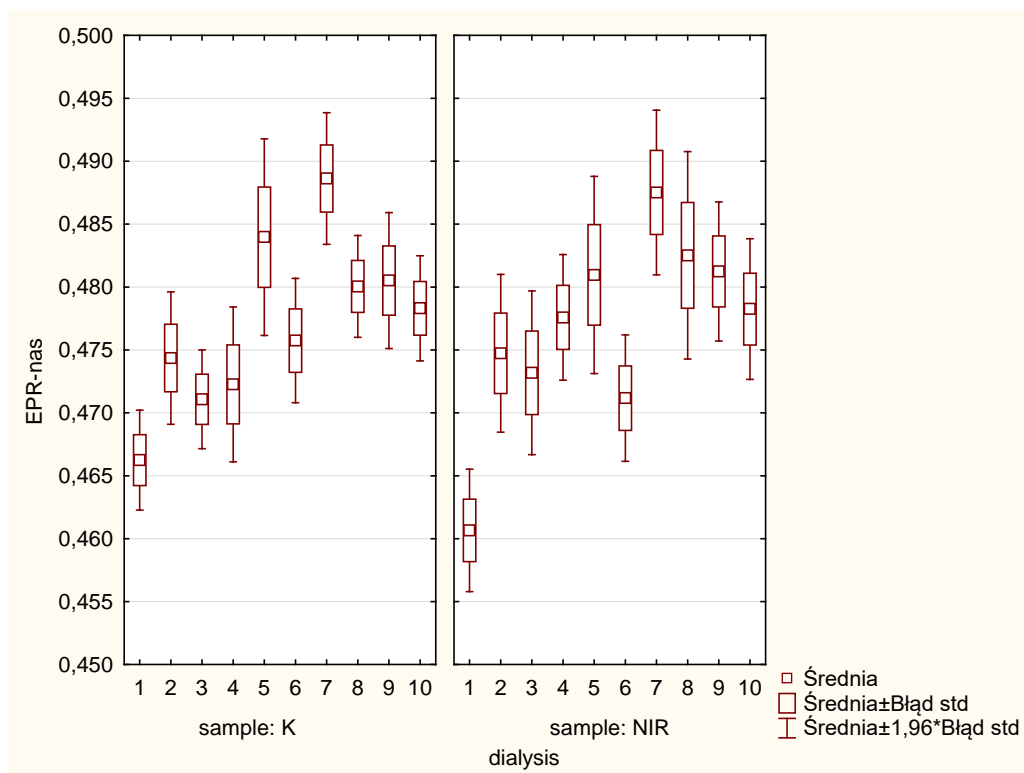
Analizując zmiany zdolności do agregacji w odpowiedzi na ADP zachodzące z dializy na dializę można zauważyć utrzymywanie się jej wielkości dla grupy naświetlanej na wyższym poziomie nawet mimo znaczącego spadku zaobserwowanego między pierwszą a drugą dializą (o ok. 35%). W obu grupach najsłabsze odpowiedzi komórek na ADP zanotowano mniej więcej w środku całego cyklu dializ. Dodatkowo promieniowanie NIR w końcowych sesjach dializy przyczyniło się do odwrócenia tej tendencji, polepszając własności agregacyjne płytek (Rys. 36). W przypadku odpowiedzi płytek na kolagen także ujawnia się, taka sama zależność, osiągając najniższy stan dla 6 dializy w grupie kontrolnej i 5 dializy w grupie naświetlanej (spadek odpowiednio o ok. 35% i ponad 50% w porównaniu z pierwszą dializą). Te rezultaty wskazują, że na skutek działania promieniowania NIR następuje przyspieszenie zachodzących zmian. W przeprowadzonych kolejnych zabiegach hemodializy płytki z obu grup stopniowo odzyskiwały zdolności agregacyjne wywoływane kolagenem (Rys. 37). Opisywany wpływ stosowania kolejnych dializ na agregację płytek indukowaną kolagenem charakteryzuje się niższym średnim poziomem i większym zakresem zmienności w grupie naświetlanej, co może świadczyć o działaniu tego promieniowania na receptory wrażliwe na kolagen bądź wtórne procesy wywołane tym agonistą. Pomiary spektrometryczne EPR zmian płynności błony płytek z dializy na dializę pokazują dla obu grup (kontrolna i naświetlana) tendencję wzrostową parametru EPR-nas do 5-6 zabiegu świadcząca o spadku aktywności komórek, co koreluje ze zmierzonym spadkiem odpowiedzi agregometrycznej w trakcie tylu cykli dializ (Rys. 38). Wyraźny skok płynności błony nastąpił między 6. a 7. hemodializą, obrazując skutek 24h przerwy między przeprowadzonymi sesjami. Od momentu przeprowadzenia siódmej dializy parametr płynności wykazał spadek. W grupie naświetlanej obniżenie to miało charakter ciągły świadczący o postępującej poprawie stanu płytek pod wpływem działania tego promieniowania. Natomiast w grupie kontrolnej ujawnił się w postaci jednorazowego spadku i następnie stabilizacji. Zmiany zarówno aktywności agregacyjnej jak i na poziomie błonowym płytek zachodzące w trakcie dializ różnią się w sposób istotny statystycznie między grupą kontrolną i naświetlaną. Choć analizy nie wykazały istotnego statystycznie zróżnicowania wyznaczanego parametru czasowego związanego z płynnością błony między omawianymi grupami wraz z kolejnymi dializami, to zachodzące zmiany są bardziej stabilne po naświetlaniu. W przeciwieństwie do grupy naświetlanej komórki kontrolne wykazały tendencję do jego wydłużania w następujących po sobie zabiegach. Jednocześnie zakres zmienności tego parametru zwiększa się po naświetlaniu, co być może jest efektem różnicującego działania promieniowania NIR na płytki.



Rys. 36. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.



Rys. 37. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.



Rys. 38. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.

### 5.5. Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną w przebiegu zmian zachodzących wraz prowadzeniem kolejnych dializ (zmiany w czasie od 1. do 10. zabiegu) w zależności od miejsca pobrania krwi, oddzielnie przed (B) i za (A) dializatorem

W kolejnej grupie analiz wyników badań kolejnych dializ (od 1 do 10) podjęto próbę oceny istotności wpływu miejsca pobrania krwi (przed i za dializatorem) z jednoczesnym podziałem na grupę kontrolną i naświetlaną (NIR). Wyniki analiz pokazują, że płytki po przepływie krwi przez dializator wykazują większe zróżnicowanie odpowiedzi na stymulację kolagenem w porównaniu z płytkami krwi przed dializatorem zarówno w grupie kontrolnej jak i naświetlanej, przy czym przebieg wyników uzyskanych w wyniku działania promieniowania wskazuje na zmniejszenie tego rozrzutu (Tab. 16 - Tab. 19). Dodatkowo efekt przejścia krwi przez dializator jest różny (Rys. 39; mimo braku istotności statystycznej). Płytki kontrolne za dializatorem przeważnie silniej (lub bez istotnych różnic) agregują pobudzone tym agonistą w porównaniu z ich zdolnością przed kontaktem z błoną dializatora. Po naświetlaniu działanie to ulega odwróceniu, manifestując osłabiający (lub niezmienny) skutek przepływu przez dializator. Odpowiedź agregometryczna obu grup wraz z prowadzeniem kolejnych dializ

ujawnia tendencję malejącą do piątej dializy o ok. 40% i 50% odpowiednio próbek kontrolnych i naświetlanych pobranych przed dializatorem.

Tab. 16. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkę pobrane **przed dializatorem, kontrola**.

Zmienna	B/A=B, próbka=K Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	29339,35	9	3259,928	476416	197	2418,357	1,348	0,214428
ADP (AUC)	53685,87	9	5965,097	1711523	197	8687,936	0,687	0,720584
EPR-czas	4,00	9	0,445	88	197	0,446	0,996	0,444702
EPR-nas	<b>0,01</b>	<b>9</b>	<b>0,001</b>	<b>0</b>	<b>197</b>	<b>0,000</b>	<b>3,998</b>	<b>0,000104</b>

Tab. 17. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkę pobrane **przed dializatorem, NIR**.

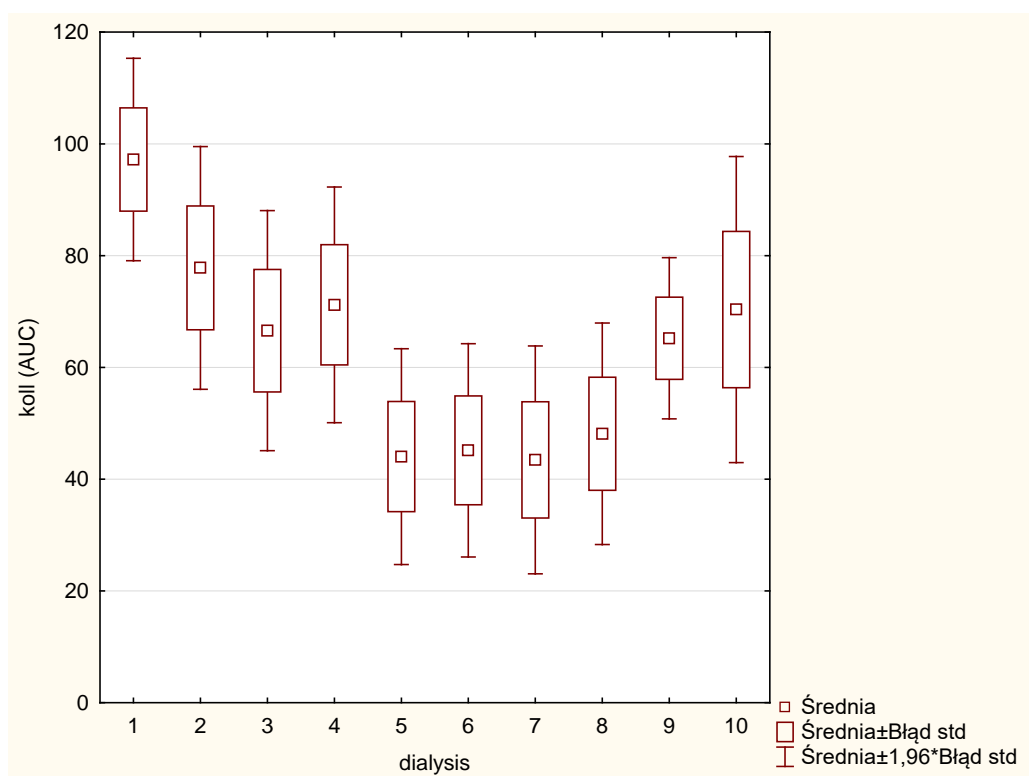
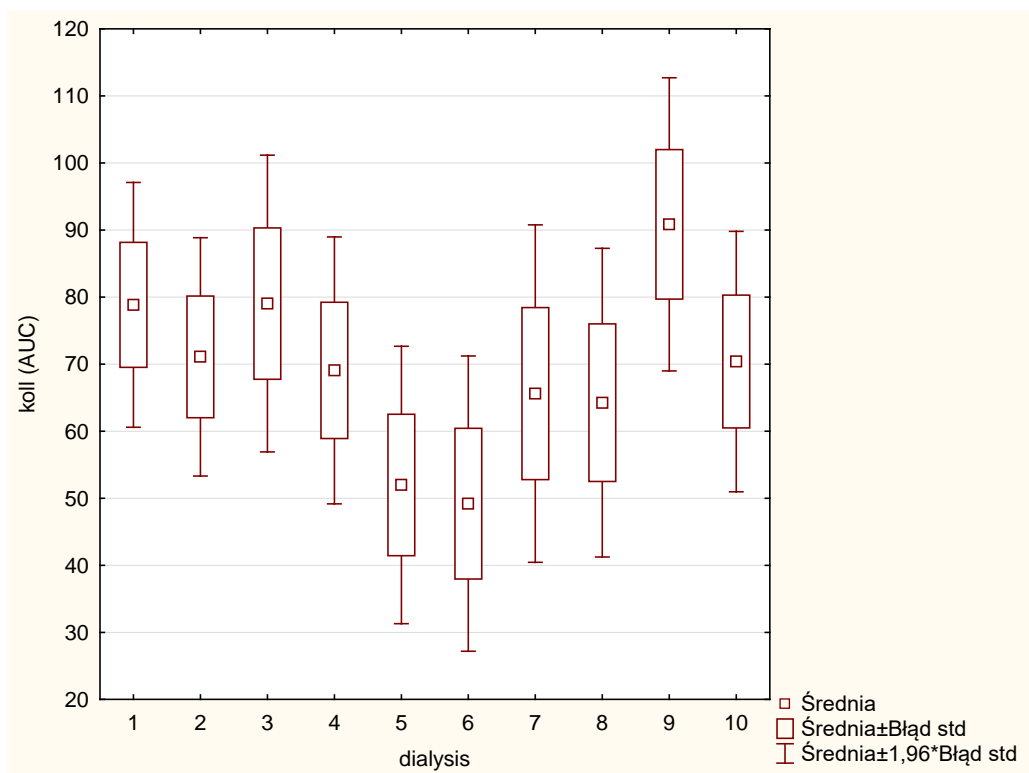
Zmienna	B/A=B, próbka=NIR Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	<b>41919,0</b>	<b>9</b>	<b>4657,66</b>	<b>221090,9</b>	<b>137</b>	<b>1613,803</b>	<b>2,886</b>	<b>0,003739</b>
ADP (AUC)	<b>144493,2</b>	<b>9</b>	<b>16054,80</b>	<b>745043,9</b>	<b>137</b>	<b>5438,277</b>	<b>2,952</b>	<b>0,003094</b>
EPR-czas	3,5	9	0,39	60,1	137	0,439	0,889	0,536741
EPR-nas	<b>0,0</b>	<b>9</b>	<b>0,00</b>	<b>0,0</b>	<b>137</b>	<b>0,000</b>	<b>2,883</b>	<b>0,003767</b>

Tab. 18. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkę pobrane **za dializatorem, kontrola**.

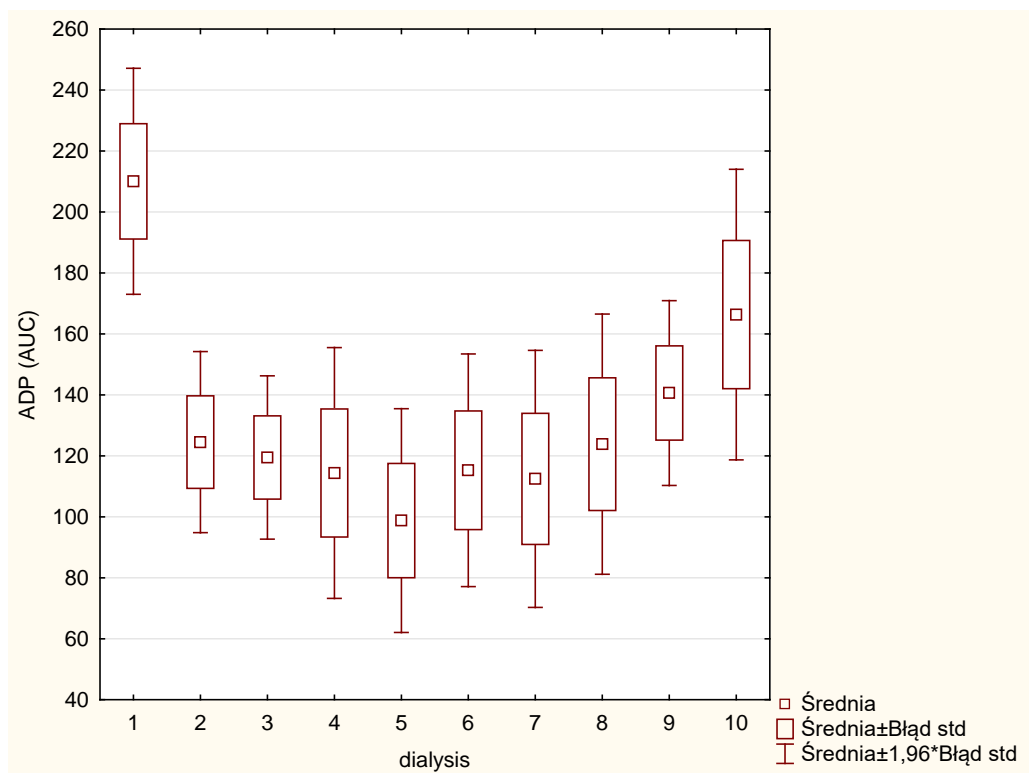
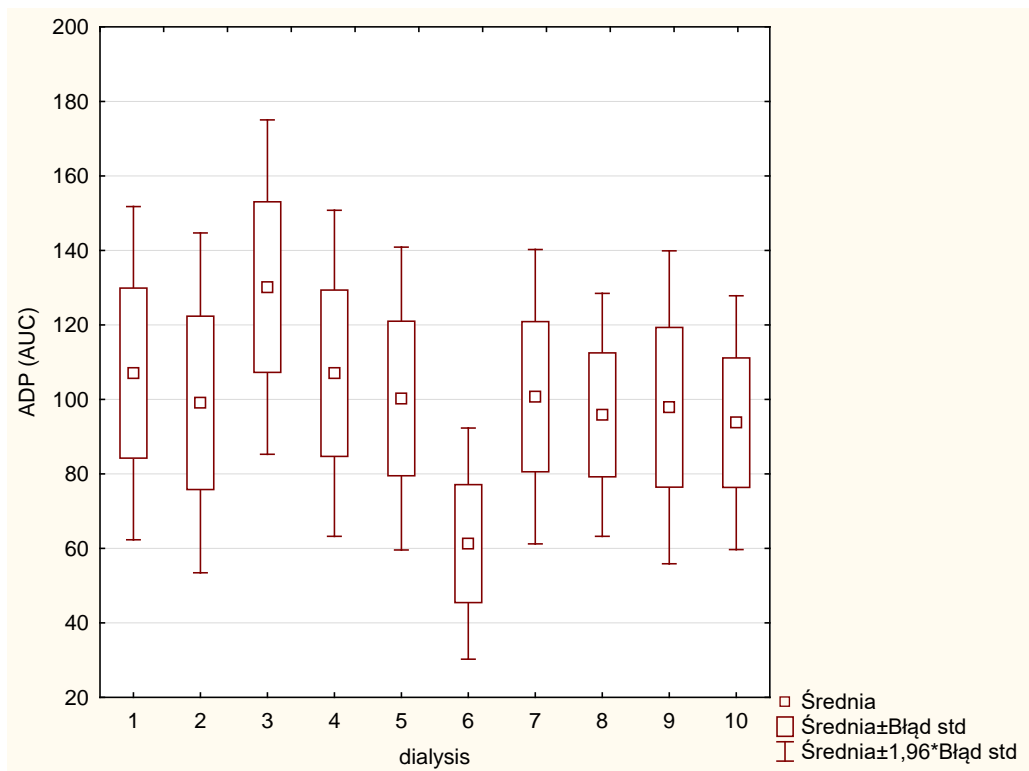
Zmienna	B/A=A, próbka=K Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	11150,26	9	1238,918	294885,9	128	2303,796	0,538	0,844702
ADP (AUC)	29004,12	9	3222,680	786547,3	128	6144,901	0,524	0,854661
EPR-czas	7,73	9	0,859	65,4	128	0,511	1,681	0,100075
EPR-nas	<b>0,01</b>	<b>9</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0</b>	<b>128</b>	<b>0,000</b>	<b>2,401</b>	<b>0,015055</b>

Tab. 19. Wyniki dwuczynnikowej ANOVA. Czynniki: K/NIR; przekroje wzdłuż dializ. Próbkę pobrane **za dializatorem, NIR**.

Zmienna	B/A=A, próbka=NIR Analiza wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	20374,10	9	2263,789	153709,2	88	1746,695	1,296	0,250542
ADP (AUC)	67192,05	9	7465,784	455249,5	88	5173,289	1,443	0,182240
EPR-czas	0,70	9	0,078	59,2	88	0,672	0,115	0,999247
EPR-nas	<b>0,01</b>	<b>9</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0</b>	<b>88</b>	<b>0,000</b>	<b>2,770</b>	<b>0,006670</b>



Rys. 39. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **przed dializatorem**.



Rys. 40. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbkę pobrana **przed dializatorem**.

Mimo silnego zwiększenia zakresu zmienności próbek za dializatorem, szczególnie grupy kontrolnej, dostrzegalny jest także podobny, lecz łagodniejszy trend spadkowy. Wyniki obu grup z kolejnych dializ demonstrują występowanie stabilizacji, po której wraz z dalszymi zabiegami następuje powolne wzmacnianie odpowiedzi płytek na pobudzenie kolagenem, które jest widoczne silniej w próbkach pobranych przed dializatorem. Charakter tych zmian ma przebieg łagodniejszy, bardziej uporządkowany i „monotoniczny” pod wpływem działania NIR. Należy podkreślić, że prezentowane zmiany odpowiedzi agregometrycznej po zastosowaniu kolagenu zachodzące w następstwie prowadzenia kolejnych dializ wykazują istotne statystycznie różnicowanie jedynie dla próbek naświetlanych pobranych przed dializatorem, co jest prawdziwe również dla drugiego agonisty, ADP.

Reakcja płytek z grupy naświetlanej na działanie ADP pokazuje zbliżony przebieg zmian, jednak o większej amplitudzie dla pierwszych dializ (Rys. 40). Wskutek naświetlania nastąpiło znaczne pogorszenie agregacji płytek między pierwszą a drugą dializą o ok. 60% i 50% w próbkach pobranych odpowiednio przed i za dializatorem. Mimo tego spadku aktywność płytek naświetlanych w postaci odpowiedzi na ADP w porównaniu z płytkami grupy kontrolnej utrzymuje się na nieco wyższym poziomie zarówno przed i za dializatorem. Promieniowanie NIR w próbkach pobieranych przed dializatorem wykazuje działanie odwracające upośledzenia agregacji już po piątej dializie w postaci stopniowego jej wzmacniania nawet o ok. 70% w ostatniej przeprowadzonej dializie, które w grupie kontrolnej mimo podobnego, lecz jednorazowego skoku (o ok. 40%) utrzymują się na stałym, niższym poziomie. W grupie kontrolnej zauważalne są częściej niższe wartości odpowiedzi agregometrycznej, szczególnie w pierwszej połowie prowadzonych dializ, płytek z krwi pobranej po przejściu przez dializator w porównaniu z tymi przed. Analizując wyniki grupy naświetlanej można dostrzec liczniej występujące zjawisko wzmocnienia zdolności do pobudzenia po przejściu przez dializator przy jednoczesnym zwiększeniu rozrzutu wartości.

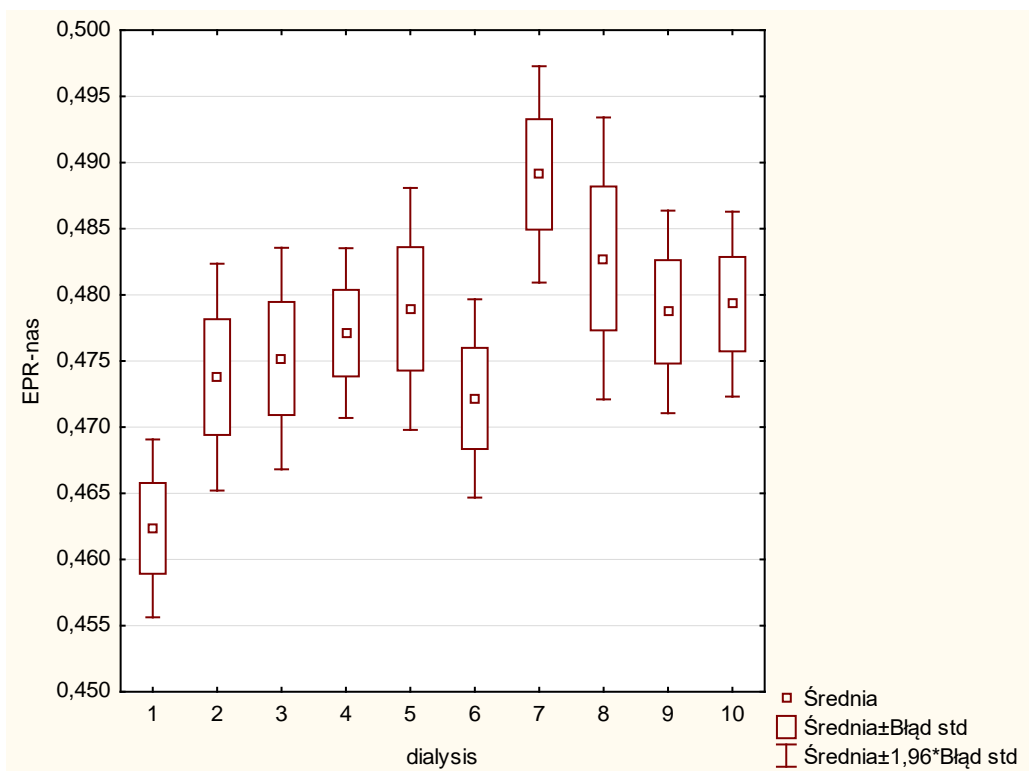
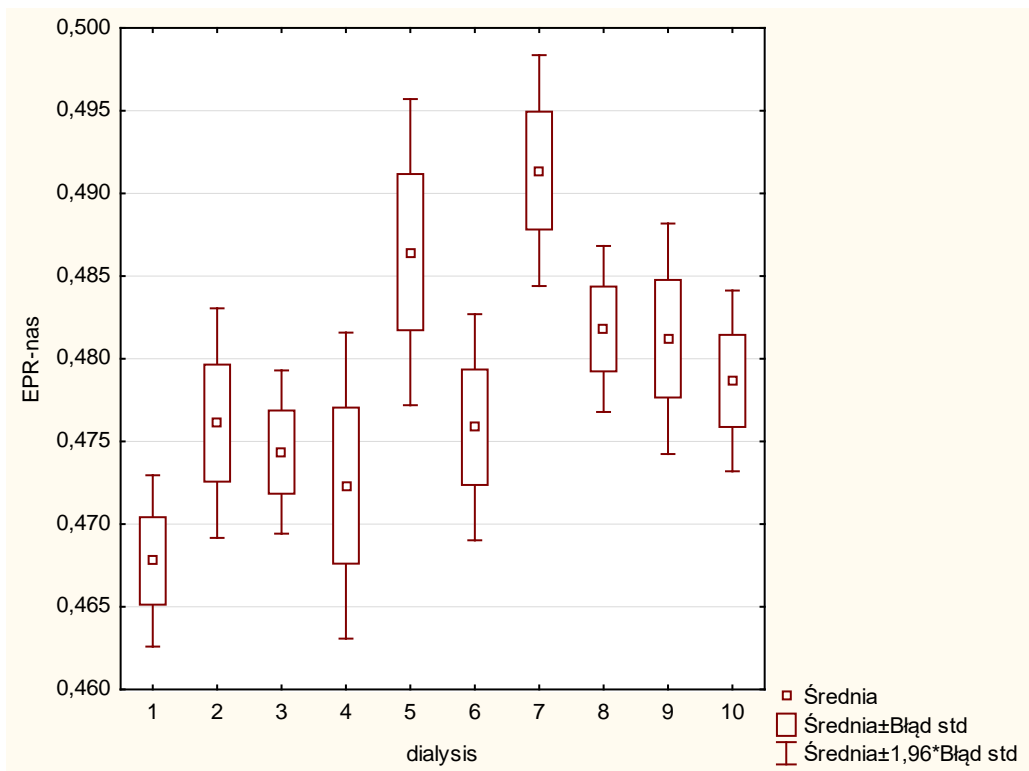
Zmienność wartości parametru opisującego płynność błony zachodząca wraz prowadzeniem kolejnych zabiegów w obu grupach (kontrolna i naświetlana) oraz w próbkach pobranych przed/za dializatorem wskazuje na tendencję rosnącą do 6-7 dializy. Silniejszy wzrost wykazują płytki naświetlane zarówno przed i po przejściu przez dializator. W kolejnych prowadzonych dializach parametr ten demonstruje spadek lub stabilizację. Większy spadek płynności błony wykazują płytki kontrolne przed dializatorem w porównaniu z naświetlanymi, co świadczy o ochronnym działaniu NIR. Płytki we krwi pobranej za dializatorem w późniejszych dializach przejawiają stabilny poziom płynności błony, przy czym wskutek



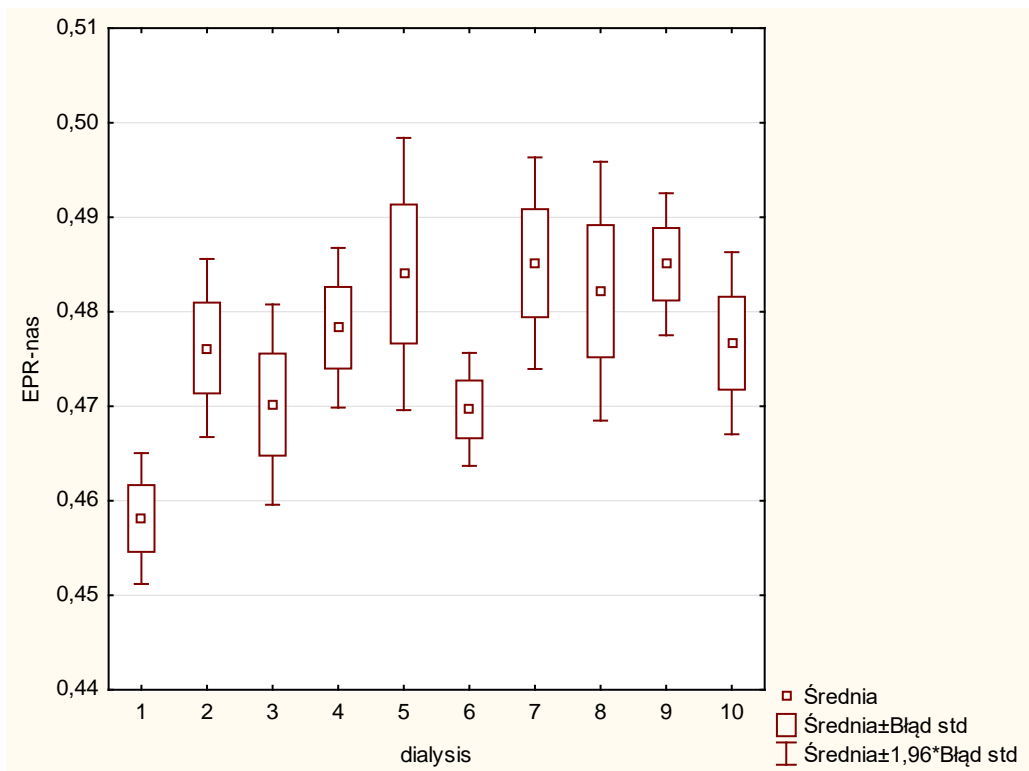
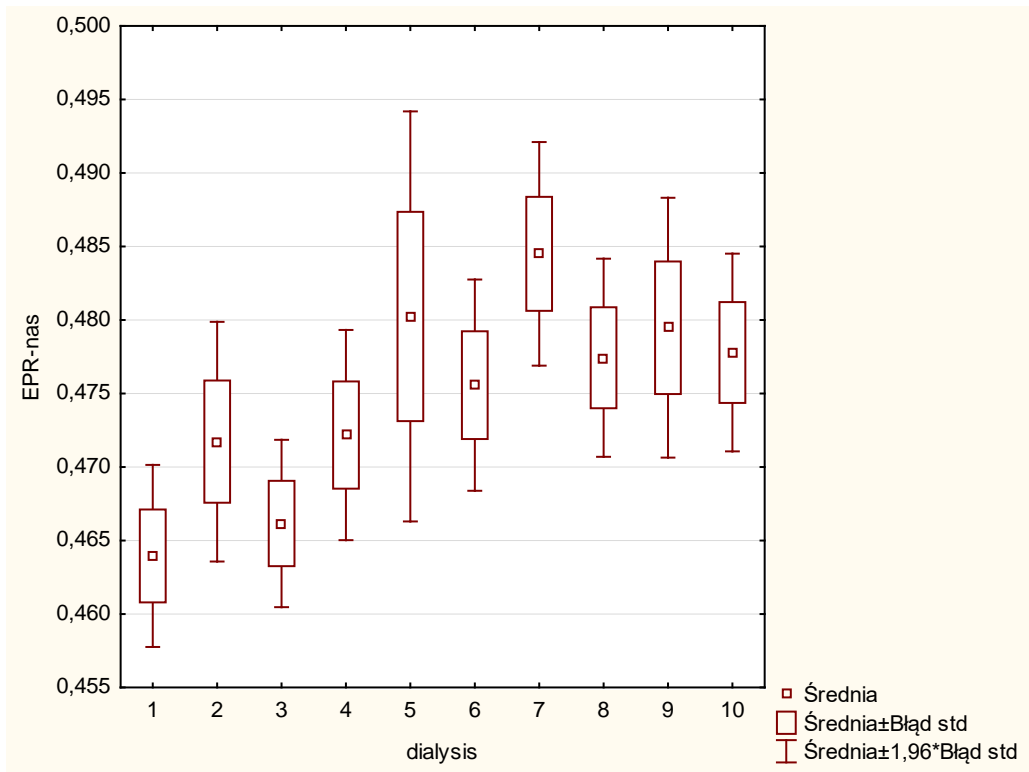
naświetlania utrzymuje on wyższą wartość. Podobnie do parametrów opisujących zdolności agregacyjne także ta własność płytek wykazywała większą zmienność w próbkach pobranych po przejściu przez dializator w porównaniu przed dializatorem. Przebieg zmian w błonie płytek naświetlanych jest łagodniejszy i bardziej uporządkowany z dializy na dializę. W próbkach krwi pobranych przed dializatorem można zaobserwować stabilizujące działanie promieniowania NIR, które utrzymuje rozrzut wartości w podobnym zakresie. Ten efekt nie jest już zauważalny w próbkach po przejściu przez dializator. Wyznaczany spektroskopowo parametr płynności błony wykazuje jej zmniejszenie lub brak zmian (dializa nr 4,6 i 10) wskutek przepływu przez dializator w grupie kontrolnej. Natomiast w grupie naświetlanej częściej nie ulegał zmianie, a nawet w niektórych przypadkach promieniowanie powodowało większą płynność błony po kontakcie z membraną dializatora. W przeciwieństwie do pomiarów agregometrycznych metoda badająca zmiany w płynności błony płytek potrafiła wskazać wpływ przerwy między prowadzonymi dializami (między 6 a 7 dializą) na stan aktywności płytek, co przejawiało się polepszeniem aktywności dzięki jednodniowej przerwie. Dodatkowo należy podkreślić, że jako jedyny wykazuje on zróżnicowanie w przebiegu dializ grupy kontrolnej i naświetlanej zarówno w próbkach pobranych przed jak i za dializatorem. Świadczy to o bardzo dużej czułości parametru na zmiany aktywności płytek.

Wyznaczany z widm EPR parametr czasu ustalania się równowagi płynności błony nie wykazał wyraźnej charakterystyki zmian zachodzących w kolejnych dializach (Rys. 41 i Rys. 42). Wyniki w grupie kontrolnej próbek pobranych przed dializatorem wskazały jego wydłużenie jedynie w ostatniej sesji, natomiast w próbkach za dializatorem poza poszerzeniem zakresu zmienności tego parametru ujawniły jego tendencję rosnącą przerwana jedynie spadkiem podczas piątego zabiegu. Naświetlanie promieniowaniem NIR spowodowało zwiększenie zarówno amplitudy zmian jak i przedziału zmienności wartości w próbkach pobranych przed dializatorem bez ich ukierunkowania w przebiegu dializ. W przypadku próbek z za dializatora jego zastosowanie skutkowało ustabilizowaniem poziomu uśrednionej wartości tego parametru w całym cyklu z jednoczesnym działaniem wzmagającym zróżnicowanie w obrębie poszczególnych zabiegów, szczególnie podczas środkowych sesji. Zmienność tego parametru nie pozwala na jednoznaczną ocenę wpływu prowadzenia dializ na płytki krwi.

Wyniki testów jednorodności wariancji oraz wykresy dla wszystkich badanych zmiennych zostały zamieszczone w **Załączniku 4**.



Rys. 41. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **przed dializatorem**.



Rys. 42. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **za dializatorem**.

## 6. Dyskusja wyników

Sumarycznie traktując wyniki doświadczenia najważniejszym wnioskiem wpływającym z przeprowadzonych doświadczeń jest to, że promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) niewątpliwie wpływa na aktywność płytek w czasie 10-dniowych hemodializ u owiec po nefrektomii. Powstaje jednak pytanie: czy wpływ promieniowania w jakiś sposób chroni płytki? Informacje o stanie płytek zostały uzyskane za pomocą trzech metod:

- Pomiar płynności błony;
- Dwie równoległe metody pomiaru zdolności agregacyjnej płytek.

Płytki odpowiadały na aktywatory: kolagen, ADP i powierzchnię szkła. Aktywatory zostały wybrane nieprzypadkowo: płytka aktywuje się, gdy włókna kolagenowe pojawiają się na skutek uszkodzenia tkanki. W drugim przypadku aktywacja następuje, gdy z uszkodzonych erytrocytów wydostaje się ADP, aktywacja płytki wywołuje także wydzielanie się ADP. Jest to więc drugi etap następujący w czasie zaistniałych uszkodzeń tkanek. Trzeci aktywator to odpowiedź płytek na skutek kontaktu z powierzchnią obcą oraz z alkalicznym pH jego powierzchni. Z zachowania się płytek pod wpływem wybranych aktywatorów, w pierwszym przybliżeniu będzie można stwierdzić, który proces aktywacji zostaje zablokowany odwracalnie przez promieniowanie NIR.

Analizując wyniki z przebiegu wszystkich dializ w czasie wyraźnie widać, że stan płytek krwi jest zależny zarówno od punktu poboru próbek (przed i za dializatorem) jak i czasu trwania zabiegu. Sam przepływ przez dializator skutkuje pogorszeniem stanu płytek. Efekt ten nasila się w trakcie przeprowadzanej procedury, przyczyniając się do modyfikacji centrów odpowiedzialnych za zmniejszenie ich zdolności do aktywacji. Wyniki uzyskane przy użyciu agonisty ADP wskazują, że płytki poddane działaniu promieniowania NIR wykazują wyraźnie większą aktywność (przed i za dializatorem) niż płytki kontrolne i ich stan wyjściowy po zabiegu jest lepszy. Należy zauważyć, wyniki z początku dializy odzwierciedlają aktywność płytek i ich stan po poprzednich dializach. Ich wyższy poziom na skutek naświetlania sugeruje, że płytki dzięki promieniowaniu NIR pomimo spadku aktywności i ilości komórek zachodzących z dializy na dializę, zachowują lepszą zdolność do aktywacji. Po zakończeniu całej serii zabiegów płytki te znajdują się w lepszej kondycji niż kontrolne. Porównując wyniki otrzymane z zastosowaniem ADP i kolagenu widać odmienne trendy: poprzez zastosowanie NIR osłabiliśmy ich odpowiedź na działanie kolagenu, co sugeruje, że promieniowanie wpływa na receptory wrażliwe na to białko, częściowo je blokując. Zmiany parametru nasyceniowego

EPR pokazują wpływ dializy na płytki: postępujący spadek płynności błony świadczy o dokonujących się w wyniku działania zabiegu procesów aktywujących komórki i w efekcie pogarszających ich funkcjonalność. Brak wyraźnych różnic tego parametru dla próbek naświetlanych i kontrolnych można próbować tłumaczyć tym, że parametr płynnościowy naświetlanych płytek odzwierciedla całościowy stan błony, a efekty jego zwiększania na skutek ADP i zmniejszania przy pobudzaniu kolagenem ulegają kompensacji.

Obraz zmian w aktywności płytek podczas kolejnych hemodializ ukazuje wyraźniej nakreślony w grupie naświetlanej spadek funkcjonalnej jakości płytek w porównaniu z grupą kontrolną. Ich agregacja wywołana ADP i kolagenem ulega osłabieniu do około połowy prowadzonego cyklu, po czym następuje powolne odzyskiwanie zdolności do aktywacji. Pomimo wyraźnego trendu wykazywanego przez płytki grupy kontrolnej poziom ich odpowiedzi na pobudzenie ADP pozostaje niższy, a dla kolagenu – wyższy w stosunku do grupy NIR, co wydaje się stanowić potwierdzenie przypuszczalnego przeciwstawnego efektu zastosowanego promieniowania na różne receptory. Proces niekorzystnych skutków stosowania dializ ujawnia się we wzroście płynności parametru EPR charakteryzującej obniżenie zdolności do aktywacji, który w drugiej połowie cyklu ulega delikatnemu spadkowi. Co ciekawe, dzień przerwy między kolejnymi zabiegami w cyklu prowadzonych hemodializ nie pozostał bez wpływu na kondycję płytek, co zademonstrowały zmiany parametru nasycenia EPR między szóstą a siódmą procedurą. Wszystkie płytki reprezentowały widoczny wzrost parametru mierzony niezależnie od miejsca pobrania próbki, ale słabo obserwowany w odpowiedzi agregometrycznej. Efekt ten sugeruje zachodzenie dodatkowych procesów mających wpływ na płynność błony, które nie mają bezpośredniego przełożenia na zdolność do aktywacji w danym momencie bądź implikują zaobserwowaną w dalszej części stopniową poprawę funkcjonalności płytek.

W trakcie hemodializy dochodzi do aktywacji płytek, która dokonuje się na bazie odmiennych mechanizmów. Z przepływającej krwi w kontakcie z dializatorem dochodzi do adsorpcji białek osoczowych na powierzchni membrany. Wskutek tego dochodzi do ich zmian konformacyjnych pozwalających na aktywację przepływających w pobliżu płytek za pośrednictwem odpowiednich receptorów. W trakcie prowadzenia doświadczeń został zaobserwowany efekt zdecydowanej minimalizacji osadzania się białek w postaci redukcji powstawania skrzepów na dializatorach uzyskany w wyniku naświetlania (Rys. 43). Zjawisko to stanowi potwierdzenie, że efektem działania promieniowania NIR są także białka, które prawdopodobnie poprzez zmianę konformacji lub ładunku słabiej się adsorbują na powierzchni

dializatora lub zmiany w strukturze białka nie aktywują odpowiednich centrów na powierzchni komórek [136].



Rys. 43. Zdjęcia dializatorów dla prób kontrolnych (powyżej; bez naświetlania) oraz naświetlanych promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR; poniżej).

Aktywacja płytek może być również wynikiem zaburzeń w przepływie krwi, który ma miejsce na wejściu linii do dializatora. Nielaminarny przepływ i przejście przez dializator znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach prezentujących aktywację płytek. Nie można zapominać, że aktywacja płytek zachodzi również na skutek stresu oksydacyjnego innych komórek krwi wywołanych krążeniem pozaustrojowym. Nasze badania [21, 131, 132, 135] potwierdzają doświadczenia prezentowane w literaturze, że zastosowanie promieniowania NIR pozwala na redukcję stresu oksydacyjnego, tym samym ograniczając aktywację płytek. Podsumowanie uzyskanych wyników badań własnych zamieszczono w Tab. 20 i Tab. 21.

Tab. 20. Podsumowanie wyników badań własnych dla pojedynczych dializ realizowanych przed i za dializatorem, dla prób kontrolnych oraz NIR.

Pojedyncza dializa, różnice pomiędzy czasem poboru próbek						
Zmienna	Przed dializatorem			Za dializatorem		
	Kontrola	NIR	wniosek	Kontrola	NIR	wniosek
Nasylenie	Ostry spadek wartości. Próbka 2 ma wartość wyższą od NIR	próbki 2 i 4 stabilne, wartości porównywalne z próbką 4 w kontroli	Ostry spadek oznacza gwałtowną aktywację płytek nienaświetlanych. Próbki NIR stabilne, spada po kilkakrotnym przejściu przez dializator	Wartości praktycznie porównywalne chociaż mimo statystycznego braku różnicy wartości dla NIR nieco wyższe	Obydwie próbki statystycznie porównywalne	Mimo braku różnic w płynności błony płytki NIR w dalszym ciągu są aktywne
ADP	Znacznie mniejsza agregowalność w stosunku do NIR, Różnica pomiędzy próbką 2 a 4. 4i5 niska agregowalność i stabilna	Wysoka agregowalność, duża różnica pomiędzy próbką 2i4. Osiąga w tym punkcie minimum, próbka 5 wzrost agregowalności	Niewielkie różnice, słaba reakcja na ADP dla kontroli. Próbki NIR bardzo aktywne, wygląda na to, że naświetlanie trochę regeneruje, lepsze parametry dla 5	Agregowalność próbek K znacznie mniejsza od NIR. Duża różnica pomiędzy próbką 3 i 6, spadek agregowalności	NIR wyższa agregowalność a różnice pomiędzy 3 i 6 statystycznie nieznaczące. Próbki stabilne	Duże różnice w agregowalności. Wyższa dla NIR, ale też ta próbka jest stabilna w czasie
Koll	Słaba reakcja na kolagen. Próbki 2 dla K i NIR porównywalna agregowalność Praktycznie stabilna dla wszystkich próbek	Stopniowy znaczący spadek agregowalności pomiędzy próbką 2 i 5.	Kontrola słabo reaguje na kolagen. NIR aktywniejsze	Agregowalność nieco wyższa niż dla NIR. Praktycznie niezmienna dla próbek 3 i 6	NIR mniejsza agregowalność w porównaniu z K. najmniej wrażliwa próbka 6 NIR	Słabsza reakcja na koll dla NIR

Tab. 21. Podsumowanie wyników badań własnych dla ogółu dializ realizowanych przed i za dializatorem.

Porównanie wszystkich dializ		
Zmienna	Przed dializatorem	Za dializatorem
Nasylenie	Przebieg zmian nasycenia w obu przypadkach jest podobny. Najniższa wartość w dializie 1 potem wzrost i stabilizacja następnie znowu wzrost do 6 dializy i powolny spadek. Maksimum wzrostu przypada na 7 dializę- na dzień, w którym dializa nie odbywała się, po tym dniu płynność spadała i była porównywalna z 6 dializą	Dla dializ prowadzonych przy naświetlaniu NIR różnice pomiędzy dializami były znacznie ostrzejsze. 1 dializa charakteryzowała się ostrym spadkiem parametru. Dzień wolny spowodował znaczny wzrost a następnie 8, 9 i 10 dializa stabilizowała mierzony parametr
ADP	Dla dializy prowadzonej bez naświetlania agregowalność utrzymuje się na prawie tym samym poziomie, jednocześnie jest niższa w porównaniu z NIR	Przebieg zmienności agregowalności dla dializy prowadzonej przy ciągłym promieniowaniu NIR wykazuje dużą dynamikę. Duża różnica pomiędzy 1 a 2 dializą. Gwałtowny spadek. Znacznie wolniejszy spadek obserwuje się do 4 dializy i po stabilizacji pod koniec dla dializy 9 i 10 wyraźny wzrost aktywności płytek
Koll	Reakcja płytek na kolagen jest bardziej urozmaicona w porównaniu z ADP. Pierwsze trzy dializy słabo wpływają na agregowalność płytek. Od 4 dializy obserwuje się powolny spadek agregowalności aż do dializy 6 a następnie znaczny wzrost do dializy 9. Ostatnia dializa znowu obniża agregowalność.	Podobnie jak ADP płytki są bardziej wrażliwe na agonistę. Zmiany agregowalności mają większą amplitudę. Do 6 dializy obserwuje się ostry spadek agregowalności i monotoniczny wzrost od 7 dializy.



## 7. Wnioski końcowe i perspektywa dalszych badań

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń można z całą pewnością stwierdzić:

1. Sukcesem zakończył się eksperyment długotrwałej hemodializy na zwierzętach pozbawionych nerek. Zwierzęta pozbawione nerek przez cały czas prowadzonych dializ były w bardzo dobrym stanie zdrowia. Jest to pierwsza procedura hemodializy przeprowadzona na modelu zwierzęcym w tak długim okresie czasu.
2. Opracowany został system naświetlania oraz cała procedura związana z ekspozycją hemodializowanej krwi w układzie dializatora.
3. Zastosowana procedura w sposób jednoznaczny wykazała ochronne działanie NIR na płytki i krew.
4. Prostota metody, jej niska cena i efektywność wskazują, że powinna być wdrożona do praktyki lekarskiej.

Wnioski szczegółowe z dializ

1. Wyznaczany parametr nasycenia wykazuje istotne zmiany – różnice:
  - w obrębie jednej dializy,
  - z dializy na dializę,
  - między kontrolą a NIR.
2. Parametr nasycenia koreluje ze zmianami agregometrycznymi.
3. Czas narostu jest parametrem słabo różnicującym – kwestia wyznaczenia.

Elementami nowości w mojej rozprawie są:

1. Autorska dynamika zmian płynności badana metodą znaczników spinowych.
2. Potwierdzenie dynamiki obserwacjami mikroskopowymi.
3. Skorelowanie zmian płynności z odpowiedzią agregometryczną.
4. Potwierdzenie pozytywnego działania NIR na koncentraty płytkowe.
5. Wybór modelu zwierzęcego dializ – utrzymanie w dobrym stanie w ciągu serii 10 dializ.
6. Śledzenie dynamiki zmian parametrów płytek w całej serii dializ.
7. Potwierdzenie ochronnego działania NIR na płytki w czasie dializy.

Perspektywa dalszych badań w tej tematyce:

1. Kontynuacja badań w zakresie zastosowania R/NIR w przechowalnictwie krwi i osocza.
2. Kontynuacja badań związanych z hemodializą i wykorzystaniem promieniowania NIR:
  - nawiązanie współpracy z Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology;

- dobór odpowiedniego źródła finansowania do projektu krajowego (NCN, NCBiR);
- dobór odpowiedniego źródła finansowania do projektu międzynarodowego.

## Dorobek naukowy

### Publikacje

1. Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Gałęcka K., Trochanowska-Pauk N., Bohara R., Czernski A., Szuldrzyński K., Królikowski W., Detyna J., Komorowska M., *Near-infrared photobiomodulation of blood reversibly inhibits platelet reactivity and reduces hemolysis*, Nature Sci Rep., 2022, 12(1), 4042, doi: 10.1038/s41598-022-08053-y.
2. Bujok J., Walski T., Czernski A., Gałęcka K., Grzeszczuk K., Zawadzki W., Witkiewicz W., Komorowska M., *Sheep model of haemodialysis treatment*, Laboratory Animals, 2018, vol. 52, nr 2, s. 176-185, doi: 10.1177/0023677217718861.
3. Drohomirecka A., Iwaszko A., Walski T., Pliszczyk-Król A., Wąż G., Graczyk S., Gałęcka K., Czernski A., Bujok J., Komorowska M., *Low-level light therapy reduces platelet destruction during extracorporeal circulation*, Nature Sci Rep., 2018, vol. 8, art. 16963, s. 1-9, doi: 10.1038/s41598-018-35311-9.
4. Oleszko A., Olsztyńska-Janus S., Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Bujok J., Gałęcka K., Czernski A., Witkiewicz W., *Application of FTIR-ATR spectroscopy to determine the extent of lipid peroxidation in plasma during haemodialysis*, Biomed Research International, 2015, art. 245607, s. 1-8, doi: 10.1155/2015/245607.
5. Walski T., Dyrda A., Dzik M., Chludzińska L., Tomków T., Mehl J., Detyna J., Gałęcka K., Witkiewicz W., Komorowska M., *Near infrared light induces post-translational modifications of human red blood cell proteins*, Photochem Photobiol Sci., 2015, 14(11), 2035-45, doi: 10.1039/c5pp00203f.
6. Walski T., Gałęcka K., Grzeszczuk-Kuć K., Komorowska M., *Modification of the hydrogen bonding network at the reversed micelles interface by near infrared radiation*, Nukleonika, 2013, vol. 58, nr 3, s. 435-438.
7. Cytlak U., Dzik M., Walski T., Gałęcka K., Komorowska M., *The hemoglobin deformation induced by near infrared radiation – spin label study*, Current Topics in Biophysics, 2010, 33(suppl. A), 33-37.
8. Cieślik G., Gałęcka K., Janiszewska M., Raczkowski M., Siudziński T., *EPR measurements of concentration of l-alanine and hydroxyapatite for the needs of dosimetry in oncological radiotherapy*, Metrologia dziś i jutro /red. Jerzy Jakubiec, Zbigniew Moroń, Henryk Juniewicz/, Wrocław: Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2010.

## Konferencje

1. Walski T., Drohomirecka A., Wąż G., Trochanowska N., Gałęcka K., Czerski A., Witkiewicz W., Komorowska M., *The perspectives for application of the blood photobiomodulation during extracorporeal circulation*, Poster Session I. (2016). The International Journal of Artificial Organs, 39(7), 359–393.
2. Bujok J., Gałęcka K., Walski T., Jonkisz P., Kurosad A., Dąbrowska H., Bartkowiak S., Zawadzki W., *Wybrane parametry stresu oksydacyjnego u kotów z przewlekłą niewydolnością nerek*, w: XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych: per scientiam ad salutem animalium et hominum: materiały kongresowe, Lublin, 22-24 września 2016. Lublin: Wydawnictwo MORPOL, 2016. s. 85-85.
3. Gałęcka K., Walski T., Bujok J., Grzeszczuk-Kuć K., Detyna J., Komorowska M., *Monitoring of platelet membrane fluidity during dialysis of sheep*, IV Forum EMR-PL, Poznań, June 27-29, 2016.
4. Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Bujok J., Gałęcka K., Witkiewicz W., Komorowska M., *Changes in oxidative stress during hemodialysis in an experimental sheep model*, XLI Annual ESAO Congress, Rome, Italy, 17-20 September 2014, The International Journal of Artificial Organs, 2014, 37 (8): 609–643.
5. Grzeszczuk K., Bujok J., Walski T., Gałęcka K., Komorowska M., *Zmiany liczby leukocytów oraz liczebności ich populacji podczas hemodializy*, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: V symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2014: materiały konferencyjne Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2014. s. 37-38.
6. Walski T., Grzeszczuk K., Gałęcka K., Komorowska M., *Jak informacje uzyskane z widm znaczników spinowych pozwalają na interpretację zjawisk zachodzących w błonach biologicznych?*, III Forum Polskiej Grupy EMR/EPR, 23-25 czerwca 2014, Kraków: materiały forum. Kraków: Wydawnictwo "ATTYKA", 2014. s. 93-95.
7. Gałęcka K., Komorowska M., *Aktywacja trombocytów – pomiary metodą znaczników spinowych*, III Forum Polskiej Grupy EMR/EPR, 23-25 czerwca 2014, Wydział Chemii UJ, Kraków: materiały forum. Kraków: Wydawnictwo "ATTYKA", 2014.
8. Komorowska M., Walski T., Gałęcka K., *Potential of Near Infrared Radiation to improve the quality of erythrocytes*, 19th Meeting of the European Red Cell Society, Forteiland, Ijmuiden, The Netherlands, 10-13 October, 2013.

9. Grzeszczuk K., Bujok J., Walski T., Gałęcka K., Komorowska M., Witkiewicz W., *Aktywacja składników krwi w hemodializie - model zwierzęcy*, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: IV symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2013: materiały konferencyjne Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2013. s. 31-32.
10. Gałęcka K., Walski T., Komorowska M., *Zmiany lepkości osocza zachodzące pod wpływem promieniowania NIR monitorowane metodą znaczników spinowych*, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: IV symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2013: materiały konferencyjne. Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2013. s. 23-24.
11. Gałęcka K., Grzeszczuk K., Walski T., Komorowska M., *Kinetyka aktywacji płytek krwi na szklanej powierzchni*, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: IV symposium, Wrocław, 20-21 czerwca 2013: materiały konferencyjne Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2013. s. 21-22.
12. Walski T., Machalska K., Gębusia E., Grzeszczuk K., Gałęcka K., Komorowska M., *Wpływ stresu oksydacyjnego i mocznika na uszkodzenia erytrocytów - badania in vitro*, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: III symposium, Wrocław, 25-26 maja 2012: materiały konferencyjne. Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2012. s. 167-168.
13. Grzeszczuk K., Gałęcka K., Walski T., Komorowska M., *Czy promieniowanie NIR wpływa na właściwości płytek krwi?*, Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych: III symposium, Wrocław, 25-26 maja 2012: materiały konferencyjne Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2012. s. 45-46.
14. Gałęcka K., Błaszczuk M., Grzeszczuk-Kuć K., Walski T., Komorowska M., *Aktywacja płytek krwi na szklanej powierzchni - spektroskopia ESR*, III Symposium Komisji Inżynierii Biomedycznej Wrocławskiego Oddziału Polskiej Akademii Nauk, Wrocław, 25-26 maja 2012
15. Komorowska M., Gałęcka K., Walski T., *Platelet activation induced by the glass surface monitored by spin probe method*, II FORUM EMR-PL, Hucisko, 16-18 maja 2012
16. Gałęcka K., Walski T., Komorowska M., *Changes in plasma viscosity under the influence of NIR radiation monitored by spin probes*, II FORUM EMR-PL, Hucisko, 16-18 maja 2012
17. Walski T., Grzeszczuk K., Gałęcka K., Komorowska M., *In seek of NIR effective wavelengths - erythrocytes susceptibility to oxidative stress studies*, 18th meeting of

European Association for Red Blood Cell Research, Wrocław - Szklarska Poręba, 12-15 maja 2011

18. Gałęcka K., Grzeszczuk K., Walski T., Szymborska-Małek K., Komorowska M., *The better condition of blood during preservation - proposition of a new factor*, 18th Meeting EARCR 2011, Wrocław - Szklarska Poręba, 12-15 maja 2011
19. Tomków T., Mehl J., Dzik M., Walski T., Gałęcka K., Komorowska M., *NIR modified topography of the red blood cells surface – AFM microscopy*, 18th Meeting EARCR 2011, Wrocław - Szklarska Poręba, 12-15 maja 2011
20. Gałęcka K., Walski T., Grzeszczuk K., Komorowska M., *Is it possible to store platelets in low temperature?*, XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Łódź, 28-30 września 2010.
21. Walski T., Grzeszczuk K., Olsztyńska-Janus S., Gałęcka K., Szymborska-Małek K., Komorowska M., *W poszukiwaniu molekularnego mechanizmu światłoterapii*, XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Łódź, 28-30 września 2010
22. Dzik M., Grzeszczuk K., Gałęcka K., Szymborska-Małek K., Komorowska M., *Słabe strony światłoterapii*, I SYMPOZJUM Współczesna myśl techniczna w naukach medycznych i biologicznych, Wrocław, 16-17 kwietnia 2010

## Patenty

1. Tomasz J. Walski, Małgorzata Komorowska, Karolina Grzeszczuk, Katarzyna Gałęcka, Adam Oleszko, Patent. Polska, nr 227190. *Urządzenie do fotobiomodulacji krwi podczas krążenia pozaustrojowego*: Int. Cl. A61M 1/16, A61M 1/10, A61M 1/36. Zgłosz. nr 405602 z 10.10.2013. Opubl. 30.11.2017. 10 s.

## Projekty badawcze

1. *Zastosowanie promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni do protekcji elementów morfotycznych krwi w systemach pozaustrojowego obiegu krwi*, projekt Wrovasc - Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej – Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Badania i rozwój nowoczesnych technologii (Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu) realizowany w latach 2008-2013; funkcja: Wykonawca.
2. *Zahamowanie aktywacji układu krzepnięcia i ogólnoustrojowej reakcji zapalnej podczas pozaustrojowego wspomaganie oddychania w modelu zwierzęcym*, projekt rozwojowy MNiSW nr umowy N R13 0018 06/2009 realizowany we współpracy z II Katedrą Chorób

Wewnętrznych Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum realizowany w latach 2009-2012; funkcja: Wykonawca

## Piśmiennictwo

1. Adamczyk Z., Barbasz J., Ciesla M., *Mechanisms of fibrinogen adsorption at solid substrates*, Langmuir, 2011, 27, 6868–6878, doi: 10.1021/la200798d.
2. Adamczyk Z., Bratek-Skicki A., Żeliszewska P., Wasilewska M., *Mechanisms of fibrinogen adsorption at solid substrates*, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014, 14, 702–729, doi: 10.2174/1568026614666140118215158.
3. Agaiby A.D., Ghali L.R., Wilson R., Dyson M., *Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes*, Lasers Surg Med., 2000, 26(4), 357-63, doi: 10.1002/(sici)1096-9101(2000)26:4<357::aid-lsm3>3.0.co;2-o.
4. Agnihotri A., Siedlecki C.A., *Time-dependent conformational changes in fibrinogen measured by atomic force microscopy*, Langmuir, 2004, 20(20), 8846–8852, doi: 10.1021/la049239+.
5. Allen R.D., Zacharski L.R., Widirstky S.T., Rosenstein R., Zaitlin L.M., Burgess D.R., *Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy*, J Cell Biol., 1979 83(1), 126-42, doi: 10.1083/jcb.83.1.126.
6. Anders J.J., Lanzafame R.J., Arany P.R., *Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy*, Photomed Laser Surg., 2015 33(4), 183-4, doi: 10.1089/pho.2015.9848.
7. Andrews R.K., Berndt M.C., *Platelet physiology and thrombosis*, Thromb Res., 2004, 114(5-6), 447-53, doi: 10.1016/j.thromres.2004.07.020,
8. Arora RR., Mueller HS., Sinha AK., *Laser-induced stimulation of thromboxane B2 synthesis in human blood platelets: role of superoxide radicals*, Am Heart J, 1993, 125(2 Pt 1), 357-62, doi: 10.1016/0002-8703(93)90012-x.
9. Barkalow K. L., Italiano J. E., Chou D. E., Matsuoka Y., Bennett V., Hartwig J. H.,  *$\alpha$ -Adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation*, The Journal of Cell Biology, 2003, 161(3), 557–570. <http://doi.org/10.1083/jcb.200211122>.
10. Bearer E.L., Prakash J.M., Li Z., *Actin dynamics in platelets*, Int Rev Cytol. 2002, 217, 137–182, doi: 10.1016/s0074-7696(02)17014-8.
11. Bevers E.M., Verhallen P.F., Visser A.J., Comfurius P., Zwaal R.F., *Bidirectional transbilayer lipid movement in human platelets as visualized by the fluorescent membrane probe 1-[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene*, Biochemistry, 1990, 29(21), 5132–5137, doi: 10.1021/bi00473a019.
12. Bowry S. K., Kircelli F., Himmele R., Nigwekar S. U., *Blood-incompatibility in haemodialysis: Alleviating inflammation and effects of coagulation*, Clinical Kidney Journal, 2021, 14(Suppl 4), i59–i71, doi: 10.1093/ckj/sfab185.



13. Bratek-Skicki A., Żeliszewska P., Adamczyk Z., *Tuning conformations of fibrinogen monolayers on latex particles by pH of adsorption*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 103, 482–488, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.005.
14. Brill, A. G., Brilr, G. E., Kirichuk, V. F., Shenkman, B., Tamarin, I., Dardik, R., Varon, D., Savion, N., *Effect of He-Ne laser irradiation on platelet activation and aggregation*, [Article in Russian], Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny, 1999, Vol. 128, No. 7, pp. 48-50.
15. Brill, G.E., Budnik, I.A., Agadzhanova, K.V., Loginovskaya, S.E., Pravdin, A.B., Gasparyan, L.V., Makela, A.M., *Effect of laser radiation on platelet function is dependent on polarization state of laser light*, 15th International Congress of EMLA, 2010.
16. Brill' G.E., Budnik I.A., Gasparian L.V., Shenkman B., Savion N., Varon D., *Influence of laser radiation of the whole blood in vitro on adhesion and aggregation of blood platelets*, Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult, 2008, 1, 15-18.
17. Brill, G.E., Gasparyan, L.V., Makela, A.M., *Modification in relationships in the system endothelial cell-blood platelet by low level laser irradiation*, 2008, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 3(1), doi:10.1016/S1572-1000(08)70124-8.
18. Brill, A.G., Shenkman, B., Brill, G.E., Tamaryn, I., Dardik, R., Kirichuk, V.F., Savion, N., Varon, D., *Blood irradiation by He-Ne laser induces a decrease in platelet responses to physiological agonists and an increase in platelet cyclic GMP*, Platelets, 2000, 11, 87-93, doi: 10.1080/09537100075698.
19. Broberg M., Eriksson C., Nygren H., *GPIIb/IIIa is the main receptor for initial platelet adhesion to glass and titanium surfaces in contact with whole blood*, The Journal of laboratory and clinical medicine, 2002, 139(3), 163–172, doi: 10.1067/mlc.2002.121604.
20. Broberg M., Nygren H., *Platelet interactions with surface-adsorbed plasma proteins: exposure of CD62P induced by von Willebrand factor*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1998, 11, 67–77, doi: 10.1016/S0927-7765(98)00026-5.
21. Bujok J., Gašior-Głogowska M., Marszałek M., Trochanowska-Pauk N., Zigo F., Pavlák A., Komorowska M., Walski T., *Applicability of FTIR-ATR method to measure carbonyls in blood plasma after physical and mental stress*, Biomed Res Int., 2019, 2181370, doi: 10.1155/2019/2181370.
22. Bujok J., Walski T., Czernski A., Gałęcka K., Grzeszczuk-Kuć K., Zawadzki W., Witkiewicz W., Komorowska M., *Sheep model of haemodialysis treatment*, Lab Anim. 2018, 52(2), 176-185, doi: 10.1177/0023677217718861.
23. Burduli N.M., Aksenova I.Z., *Platelet aggregatory impairments in chronic obstructive bronchitis and a role of laser therapy in their correction*, Klin Med (Mosk), 2004, 82(8), 34-7.
24. Cacciafesta P., Humphris A.D.L., Jandt K.D., Miles M.J., *Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic force microscopy*, Langmuir, 2000, 16, 8167–8175, doi: 10.1021/la000362k.

25. Chai B., Yoo H., Pollack G.H., *Effect of radiant energy on near-surface water*, J Phys Chem B., 2009, 113, 13953–13958, doi: 10.1021/jp908163w.
26. Chang H.H., Lin C.H., Lo S.J., *Recombinant rhodostomin substrates induce transformation and active calcium oscillation in human platelets*, Exp Cell Res, 1999, 250(2), 387-400, doi: 10.1006/excr.1999.4547.
27. Chiumiento A., Lamponi S., and Barbucci R., *Role of fibrinogen conformation in platelet activation*, Biomacromolecules, 2007, 8, 523–531, doi: 10.1021/bm060664m.
28. Chludzińska L., Ananicz E., Jarosławska A., Komorowska M., *Near-infrared radiation protects the red cell membrane against oxidation*, Blood Cells Mol. Dis., 2005, 35, 74–79, doi: 10.1016/j.bcmd.2005.04.003.
29. Clarke M.L., Wang J., Chen Z., *Conformational changes of fibrinogen after adsorption*, The Journal of Physical Chemistry B, 2005, 109, 22027–22035, doi: 10.1021/jp054456k.
30. Cytlak U., Dzik M., Walski T., Gałęcka K., Komorowska M., *The hemoglobin deformation induced by near infrared radiation – spin label study*, Current Topics in Biophysics, 2010, 33(suppl. A), 33-37.
31. Drohomirecka A., Iwaszko A., Walski T., Pliszcak-Król A., Wąż G., Graczyk S., Gałęcka K., Czerski A., Bujok J., Komorowska M., *Low-level light therapy reduces platelet destruction during extracorporeal circulation*, Nature Sci Rep., 2018, vol. 8, art. 16963, s. 1-9, doi: 10.1038/s41598-018-35311-9.
32. Dyson M., *How photons modulate wound healing via the immune system*, Proc. SPIE 7178, Biophotonics and Immune Responses IV, 2009, 717805, doi: 10.1117/12.808291.
33. Eldar M., Gal D., Djaldetti M., Douer D., Rosner E., Katzir A., Neufeld H.N., Battler A., *Carbon dioxide laser effect on platelet function and surface ultrastructure in vitro*, Lasers Surg Med, 1988, 8(3), 259-63, doi: 10.1002/lsm.1900080307.
34. Eldar M., Marom R., Scheinowitz M., Djaldetti M., Battler A., *In vitro effects of CO<sub>2</sub> laser irradiation on platelets: Influence of aspirin*, Lasers in Medical Science, 1991, 6, 15-21, doi: 10.1007/BF02042641.
35. Gasparyan L.V., Dementjeva I.N., Makela A.M., *The influence of LED irradiation at different wavelengths with antioxidants on functional activity of blood platelets*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2008, Vol. 5; Iss. supp-S1, doi: 10.1016/s1572-1000(08)70126-1.
36. Gemmell C.H., *Platelet adhesion onto artificial surfaces: Inhibition by benzamidine, pentamidine, and pyridoxal-5-phosphate as demonstrated by flow cytometric quantification of platelet adhesion to microspheres*, The Journal of laboratory and clinical medicine, 1998, 131(1), 84–92, doi: 10.1016/s0022-2143(98)90081-6.
37. George, J.N., *Platelets*, The Lancet, 2000, Vol. 355, Issue 9214, 1531 – 1539, doi: 10.1016/S0140-6736(00)02175-9.

38. Gresele P., *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders*, Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics, Cambridge University Press, 2002.
39. Grzeszczuk K., Bujok J., Walski T., Gałęcka K., Komorowska M., Witkiewicz W., *Aktywacja składników krwi w hemodializie - model zwierzęcy*, Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych: IV sympozjum, Wrocław, 20-21 czerwca 2013: materiały konferencyjne Wrocław: Oddział Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, cop. 2013. s. 31-32.
40. Harrison P., *Platelet function analysis*, Blood Rev., 2005, 19(2), 111-23, doi: 10.1016/j.blre.2004.05.002.
41. Haycox C.L., Ratner B.D., *In vitro platelet interactions in whole human blood exposed to biomaterial surfaces: insights on blood compatibility*, Journal of biomedical materials research, 1993, 27(9), 1181–1193, doi: 10.1002/jbm.820270909.
42. Huberty, C. J., Morris, J. D., *Multivariate analysis versus multiple univariate analyses*, 1989, Psychological Bulletin, 105, 302–308, doi: 10.1037/0033-2909.105.2.302.
43. Hylton D.M., Shalaby S.W., Latour R.A. Jr, *Direct correlation between adsorption-induced changes in protein structure and platelet adhesion*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005, 73(3), 349–358, doi: 10.1002/jbm.a.30295.
44. Jurk K., Kehrel B.E., *Platelets: physiology and biochemistry*, Semin Thromb Hemost., 2005, 31(4), 381-92. doi: 10.1055/s-2005-916671.
45. Kantar A., Giorgi P.L., Curatola G., Fiorini R., *Interaction between PAF and human platelet membranes: a fluorescence study*, Mediators of inflammation, 1992, 1(2), 127–131, doi: 10.1155/S0962935192000218.
46. Karandashov, V. I., Petukhov, E. B., Zrodnikov, V. S., *Changes in platelet aggregability after blood irradiation by helium-neon laser and red light emitting diodes*, Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny, 1998, vol. 126, N 12, pp. 1215–1217, doi: 10.1007/BF02447155.
47. Karu T., *Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells*, J Photochem Photobiol B., 1999, 49(1), 1-17, doi: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.
48. Karu T.I., Afanas'eva N.I., Kol'iakov S.F., Piatibrat L.V., *Izmenenie spektra pogloshcheniia monosloia zhivyykh kletok posle nizkointensivnogo lazernogo oblucheniia [Change in the absorption spectrum of a monolayer of live cells under low-intensity laser irradiation]*, Dokl Akad Nauk., 1998, 360(2), 267-70, Russian.
49. Karu T., Pyatibrat L., Kalendo G., *Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro*, J Photochem Photobiol B., 1995, 27(3), 219-23, doi: 10.1016/1011-1344(94)07078-3.
50. Katona E., Katona G., Doaga I.O., Ionescu D., Matei R., Horváth J., Tanos E., Katona L., *Multiple low level laser irradiation effects on human peripheral blood lymphocytes and*

- platelets revealed by fluorimetric techniques*, Romanian J. Biophys., 2006, Vol. 16, No. 4, 221–228.
51. Katona E., Katona G., Doaga I.O., Ionesco D., Șeremet T., Dumitrescu M., Radeșid S., Matei R., Horváth J., Tanos E., Katona L., *Membrane effects of low level infrared laser irradiation effects, as seen in metabolically intact and impaired human blood cells*, Romanian J. Biophys., 2004, Vol. 14, No. 1-4, 99–108.
  52. Keere I.V., Willaert R., Hubin A., Vereecken J., *Interaction of human plasma fibrinogen with commercially pure titanium as studied with atomic force microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy*, Langmuir, 2008, 24(5), 1844–1852, doi: 10.1021/la7016566.
  53. Kirchhofer D., Gailit J., Ruoslahti E., Grzesiak J., and Pierschbacher M.D., *Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa*, The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265, 18525–18530.
  54. Kitagawa S., Matsubayashi M., Kotani K., Usui K., Kametani F., *Asymmetry of membrane fluidity in the lipid bilayer of blood platelets: fluorescence study with diphenylhexatriene and analogs*, The Journal of membrane biology, 1991, 119(3), 221–227, doi: 10.1007/BF01868727.
  55. Kitagawa S., Shinohara T., Kametani F., *Effects of alcohols on ADP-induced aggregation and membrane fluidity of gel-filtered bovine blood platelets*, The Journal of membrane biology, 1984, 79(1), 97–102, doi: 10.1007/BF01868530.
  56. Kloczewiak M., Timmons S., Lukas T.J., Hawiger J., *Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the gamma chain*, Biochemistry, 1984, 23(8), 1767–1774, doi: 10.1021/bi00303a028.
  57. Knight B., Goodall D.M., Greenhow R.C., *Single-photon vibrational photochemistry. Part 1.—wavelength and temperature dependence of the quantum yield for the laser-induced ionization of water*, J Chem Soc Faraday Trans., 1979, 75, 841–856, doi: 10.1039/F29797500841.
  58. Komorowska M., *Fotoproceny indukowane promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni w erytrocytach i modelach błon biologicznych*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2001, Wrocław.
  59. Komorowska M., Cuissot A., Czarnołęski A., Białas W., *Erythrocyte response to near infrared radiation*, Cell. Mol. Biol. Lett., 2001, 6, 212.
  60. Komorowska M., Cuissot A., Czarnołęski A., Białas W., *Erythrocyte response to near-infrared radiation*, J. Photochem. Photobiol. B Biol., 2002, 68 (2-3), 93–100, doi: 10.1016/s1011-1344(02)00361-5.
  61. Komorowska M., Czarnołęski A., *Near-infrared induced membrane surface electrostatic potential, fluorescent measurements*, Colloids Surf B Biointerfaces, 2001, 20(4), 309-314, doi: 10.1016/s0927-7765(00)00190-9.

62. Komorowska M., Czyżewska H., *The effect of near infrared radiation on erythrocyte membranes; ESR study*, Nukleonika, 1997, 42(2), 379-386.
63. Komorowska M., Gałwa M., Herter B., Wesołowska U., *Hydration effects under near-infrared radiation*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002, 26(3), 223-233, doi: 10.1016/S0927-7765(02)00002-4.
64. Komorowska M., Lamperski J., Komorowski L., *Near-infrared-induced proton transfer studied by electron spin resonance*, Chemical Physics, 1999, 244(1), 101-109, doi: 10.1016/S0301-0104(99)00075-0.
65. Koter M., Grzelińska E., *Interpretacja widm znaczników spinowych stosowanych w badaniach płynności lipidów błon*, Zagad. Biofiz. Współcz., 1989, 14(1), 103-122.
66. Kowalska M.A., Cierniewski C.S., *Microenvironment changes of human blood platelet membranes associated with fibrinogen binding*, The Journal of Membrane Biology, 1983, 75(1), 57-64, doi: 10.1007/BF01870799.
67. Kubina M., Lanza F., Cazenave J.P., Laustriat G., Kuhry J.G., *Parallel investigation of exocytosis kinetics and membrane fluidity changes in human platelets with the fluorescent probe, trimethylammonio-diphenylhexatriene*, Biochimica et Biophysica Acta, 1987, 901(1), 138-146, doi: 10.1016/0005-2736(87)90265-3.
68. Kujawa J., Zavodnik L., Zavodnik I., Buko V., Lapshyna A., Bryszewska M., *Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm<sup>2</sup>) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure*, J. Clin. Laser Med. Surg, 2004, 22, 111-117, doi: 10.1089/104454704774076163.
69. Lhermusier T., Chap H., Payrastra B., *Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome*, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, 9(10), 1883-1891, doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04478.x.
70. Lindon J.N., McManama G., Kushner L., Merrill E.W., Salzman E.W., *Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces?*, Blood, 1986, 68(2), 355-362.
71. Maçôas E.M.C., Khriachtchev L., Pettersson M., Lundell J., Fausto R., Räsänen M., *Infrared, induced conformational interconversion in carboxylic acids isolated in lowtemperature, rare-gas matrices*, Vib Spectrosc., 2004, 34, 73-82, doi: 10.1016/j.vibspec.2003.07.005.
72. Mazzucato M., Pradella P., Cozzi M.R., De Marco L., Ruggeri Z.M., *Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalpha mechanoreceptor*, Blood, 2002, 100(8), 2793-800, doi: 10.1182/blood-2002-02-0514.
73. Mateo C.R., Lillo M.P., González-Rodríguez J., Acuña A.U., *Molecular order and fluidity of the plasma membrane of human platelets from time-resolved fluorescence*

- depolarization*, European Biophysics Journal, 1991, 20(1), 41–52, doi: 10.1007/BF00183278.
74. Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P., *Platelets*, Academic Press, 4<sup>th</sup> Edition, 2019, doi: 10.1016/C2016-0-03693-8.
  75. Mohan S. Ram Thomas G.O., Shafique T., Grimley R.P., *Effects of Nd-YAG laser on platelet function in vitro: A comparative study using the spectraprobe, 'hot tip' and bare fibres*, Lasers in Medical Science, 1991, 6, 1-6, doi: 10.1007/BF02042639.
  76. Moskowitz K.A., Kudryk B., Collier B.S., *Fibrinogen coating density affects the conformation of immobilized fibrinogen: implications for platelet adhesion and spreading*, Thrombosis and Haemostasis, 1998, 79, 824–831.
  77. Nasri H., Baradaran A., *Platelet count and mean volume (MPV) in association with plasma HCO<sub>3</sub>- in regular hemodialysis patients*, Rev Bras Hematol Hemoter., 2006, Vol. 28(2), 127-130, doi: 10.1590/S1516-84842006000200012.
  78. Nathan I., Fleischer G., Livne A., Dvilansky A., Parola A.H., *Membrane microenvironment changes during activation of human blood platelets by thrombin*, Journal of Biological Chemistry, 1979, 254, 9822–9828, doi: 10.1016/S0021-9258(19)83590-1.
  79. Natzle W.C., Moore C.B., *Recombination of hydrogen ion (H<sup>+</sup>) and hydroxide in pure liquid water*, J. Phys. Chem, 1985, 89, 2605–2612, doi: 10.1021/j100258a035.
  80. Natzle W.C., Moore C.B., Goodall D.M., Frisch W., Holzwarth J.F., *Dissociative ionization of water induced by single-photon vibrational excitation*, J Phys Chem., 1981, 85, 2882–2884, doi: 10.1021/j150620a006.
  81. Nesbitt W.S., Giuliano S., Kulkarni S., Dopheide S.M., Harper I.S., Jackson S.P., *Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth*, J Cell Biol, 2003, 160(7), 1151-61, doi: 10.1083/jcb.200207119.
  82. Nygren H., Broberg M., *Specific activation of platelets by surface-adsorbed plasma proteins*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1998, 9(8), 817–831, doi: 10.1163/156856298x00172.
  83. Ohki K., Imai A., Nozawa Y., *Aggregation-induced alterations in human platelet membranes: A spin label study*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1980, 94(4), 1249–1255, doi: 10.1016/0006-291x(80)90553-7.
  84. Olban, M., Wachowicz, B., Koter, M., Bryszewska, M., *The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function*, Cell Biology International 1998, Vol. 22, No. 3, 245–248, doi: 10.1006/cbir.1998.0251.
  85. Oleszko A., Olsztyńska-Janus S., Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Bujok J., Gałęcka K., Czernski A., Witkiewicz W., *Application of FTIR-ATR spectroscopy to determine the extent of lipid peroxidation in plasma during haemodialysis*, Biomed Research International, 2015, art. 245607, s. 1-8, doi: 10.1155/2015/245607.

86. Olsztyńska-Janus S., Komorowska M., Dupuy N., *Influence of near-infrared radiation on the pKa values of l-phenylalanine*. Appl. Spectrosc. 60(6), 2006, 648-652, doi: 10.1366/000370206777670701.
87. Olsztyńska-Janus S., Szymborska K., Komorowska M., Lipiński J., *Conformational changes of l-phenylalanine - near infrared-induced mechanism of dimerization: B3LYP studies*, Mol. Struc. Theochem 911(1-3), 2009, 1-7, doi: 10.1016/j.theochem.2009.06.046
88. Ozaki Y., *Near-infrared spectroscopy—its versatility in analytical chemistry*, Anal Sci., 2012, 28(6), 545-63, doi: 10.2116/analsci.28.545.
89. Phillips G., Eyring E., *Pulsed-laser conductivity study of recombination kinetics of proton and hydroxide in alcohol water/liquid mixtures*. J Phys Chem., 1986, 90, 316–319, doi: 10.1021/j100274a023.
90. Popow-Woźniak A., Nowak D., Malicka-Błaszkiwicz M., *Sposoby migracji komórek nowotworowych*, Postępy Biochemii, vol 55, nr 2, 2009.
91. Rendu F., Marche P., Viret J., Daveloose D., Leterrier F., Levy-Toledano S., Caen J.P., *Molecular membrane organization in normal and pathological platelets: changes in inositide metabolism and membrane fluidity*, Nouvelle Revue Française d'hématologie, 1985, 27(4), 293–297.
92. Rendu F., Viret J., Daveloose D., Levy-Toledano S., Leterrier F., *Platelet membrane molecular organization: relationship with membrane bound calcium*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1985, 126(3), 1048–1053, doi: 10.1016/0006-291x(85)90291-8.
93. Roach P., Farrar D., Perry C.C., *Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes*, Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(22), 8168–8173, doi: 10.1021/ja042898o.
94. Rola P., Doroszko A., Szahidewicz-Krupska E., Rola P., Dobrowolski P., Skomro R., Szymczyszyn A., Mazur G., Derkacz A., *Low-level laser irradiation exerts antiaggregative effect on human platelets independently on the nitric oxide metabolism and release of platelet activation markers*, Oxid. Med. Cell. Longev, 2017, 6201797. doi: 10.1155/2017/6201797.
95. Sachs F., Feinman R.D., *Spin-labelled human platelets*, Thromb Res., 1976, 8(1), 43-50, doi: 10.1016/0049-3848(76)90121-3.
96. Salzman E.W., Lindon J., Brier D. and Merrill E.W., *Surface-induced platelet adhesion, aggregation and release*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1977, 283, 114–126.
97. Salzman E.W., Lindon J., McManama G., Ware J.A., *Role of fibrinogen in activation of platelets by artificial surfaces*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1987, 516, 184–195, doi: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb33040.x.

98. Sauerheber R.D., Zimmermann T.S., Esgate J.A., VanderLaan W.P., Gordon L.M., *Effects of calcium, lanthanum, and temperature on the fluidity of spin-labeled human platelets*, The Journal of Membrane Biology, 1980, 52(3), 201–219, doi: 10.1007/BF01869190.
99. Savage B., Shattil S.J., Ruggeri Z.M., *Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor*, The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267, 11300–11306, doi: 10.1016/S0021-9258(19)49910-9.
100. Schoorl M., *Activation of platelets and coagulation during haemodialysis*, Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk, 2016, 41, 17–27.
101. Schoorl M., Schoorl M., Nubé M.J., Bartels P.C., *Platelet depletion, platelet activation and coagulation during treatment with hemodialysis*, Scand J Clin Lab Invest., 2011, 71(3), 240-7, doi: 10.3109/00365513.2011.558106.
102. Schootemeijer A., Van Beekhuizen A.E., Tertoolen L.G., De Laat S.W., Akkerman J.W., *Cytosolic calcium ions regulate lipid mobility in the plasma membrane of the human megakaryoblastic cell line MEG-01*, European Journal of Biochemistry, 1994, 224(2), 423–430, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00423.x.
103. Sethuraman A., Han M., Kane R.S., Belfort G., *Effect of surface wettability on the adhesion of proteins*, Langmuir, 2004, 20, 7779–7788, doi: 10.1021/la049454q.
104. Shattil S.J., Cines D.B., Schreiber A.D., *Increased fluidity of human platelet membranes during complement-mediated immune platelet injury*, The Journal of Clinical Investigation, 1978, 61(3), 582–589, doi: 10.1172/JCI108969.
105. Sheppard J.I., McClung W.G., Feuerstein I.A., *Adherent platelet morphology on adsorbed fibrinogen: effects of protein incubation time and albumin addition*, Journal of Biomedical Materials Research, 1994, 28(10), 1175–1186, doi: 10.1002/jbm.820281008.
106. Sheppeck R.A., Bentz M., Dickson C., Hribar S., White J., Janosky J., Berceli S.A., Borovetz H.S., Johnson P.C., *Examination of the roles of glycoprotein Ib and glycoprotein IIb/IIIa in platelet deposition on an artificial surface using clinical antiplatelet agents and monoclonal antibody blockade*, Blood, 1991, 78(3), 673–680.
107. Shiba E., Lindon J.N., Kushner L., Matsueda G.R., Hawiger J., Kloczewiak M., Kudryk B., Salzman E.W., *Antibody-detectable changes in fibrinogen adsorption affecting platelet activation on polymer surfaces*, American Journal of Physiology - Cell Physiology, 1991, 260(5), C965–C974, doi: 10.1152/ajpcell.1991.260.5.C965.
108. Shiraishi M., Suzuki K., Nakaji S., Sugawara K., Sugita N., Suzuki K.-J., Ohta, S., *Effect of linear polarized near-infrared ray irradiation on the chemiluminescence of human neutrophils and serum opsonic activity*, Luminescence, 1999, 14, 239-243, doi: 10.1002/(SICI)1522-7243(199909/10)14:5<239::AID-BIO533>3.0.CO;2-N.
109. Siposan, D.G., Lukacs A., *Effect of low-level laser radiation on some rheological factors in human blood: an in vitro study*, J Clin Laser Med Surg, 2000, 18(4), 185-95, doi: 10.1089/10445470050144038.



110. Sit P.S., Marchant R.E., *Surface-dependent conformations of human fibrinogen observed by atomic force microscopy under aqueous conditions*, *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, 82(3), 1053–1060.
111. Sivaraman B., Latour R.A. *Delineating the roles of the GPIIb/IIIa and GP-Ib-IX-V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin*, *Biomaterials*, 2011, 32(23), 5365-70, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.011.
112. Sivaraman B., Latour R.A., *The adherence of platelets to adsorbed albumin by receptor-mediated recognition of binding sites exposed by adsorption-induced unfolding*, *Biomaterials*, 2010, 31, 1036–1044, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.017.
113. Sivaraman B., Latour R.A., *The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen*, *Biomaterials*, 2010, 31, 832–839, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.008.
114. Spasov, A. A., Nedogoda, V. V., Konan, K., *Mechanism of the hypocoagulation effect of the laser low energy radiation*, *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, 1998, Vol. 126, No. 7, pp. 36-38.
115. Spasov, A. A., Nedogoda, V. V., Konan, K., *Mechanism of platelet function alterations induces by low-intensity laser radiation*, *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, 1998, Vol. 126, No. 7, pp. 45-48.
116. Spasov, A.A., Nedogoda, V.V., Konan, K., Kucheryavenko, A.F., *Mechanism of reduction of platelet sensitivity to medicines in response to low-energy laser radiation of blood*, *Gematologiya i Transfuziologii*, 2001, Vol. 46, I. 2, 36-39.
117. Spasov, A. A., Nedogoda, V. V., Ostrovskii, O. V., Konan, K., *Membranotropic effect of low-intensity laser radiation of the blood*, *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*, 1998, Vol. 126, No. 10, pp. 412-415.
118. Stanisław A., *Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem Statistica PL na przykładach z medycyny*, 2007, t. 1-3, StatSoft, Kraków.
119. Steiner M., Lüscher E.F., *Fluorescence anisotropy changes in platelet membranes during activation*, *Biochemistry*, 1984, 23(2), 247–252, doi: 10.1021/bi00297a012.
120. Szymborska-Małek K., Komorowska M., Gašior-Głogowska M., *Effects of near infrared radiation on DNA, DLS and ATR-FTIR study*, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2018, 188, 258–267, doi: 10.1016/j.saa.2017.07.004.
121. Takahashi K., Plath K.L., Axson J.L., Nelson G.C., Skodje R.T., Vaida V., *Dynamics and spectroscopy of vibrational overtone excited glyoxylic acid and 2,2-dihydroxyacetic acid in the gas-phase*, *J Chem Phys.*, 2010, 132, 094305, doi: 10.1063/1.3327839.
122. Toscano A., Santore M.M., *Fibrinogen adsorption on three silica-based surfaces: conformation and kinetics*, *Langmuir* 2006, 22, 2588–2597, doi: 10.1021/la051641g.

123. Trofimov, V. A., Kiseleva, R. E., Vlasov, A. P., Minnebaev, M. M., Nikolaev, V. T., *Effect of He-Ne laser irradiation on thrombocyte lipids*, [Article in Russian], Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny, 1999, Vol. 127, No. 1, 43-45.
124. Tsai W.B., Grunkemeier J.M., Horbett T.A., *Human plasma fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polystyrene*, Journal of Biomedical Materials Research, 1999, 44(2), 130–139, doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199902)44:2<130::aid-jbm2>3.0.co;2-9.
125. Tsapikouni T.S., Allen S., Missirlis Y.F., *Measurement of interaction forces between fibrinogen coated probes and mica surface with the atomic force microscope: the pH and ionic strength effect*, Biointerphases, 2008, 3, 1–8, doi: 10.1116/1.2840052.
126. Tsapikouni T.S., Missirlis, Y.F., *pH and ionic strength effect on single fibrinogen molecule adsorption on mica studied with AFM*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007, 57(1), 89–96, doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.01.011.
127. Tzoneva R., Heuchel M., Groth T., Altankov G., Albrecht W., Paul D., *Fibrinogen adsorption and platelet interactions on polymer membranes*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2002, 13(9), 1033–1050, doi: 10.1163/156856202760319171.
128. Vladimirov Y.A., Osipov A., Klebanov G., *Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation*, Biochemistry (Mosc), 2004, 69, 81–90, doi: 10.1023/b:biry.0000016356.93968.
129. Vogler E.A., *Protein adsorption in three dimensions*, Biomaterials, 2012, 33(5), 1201–1237, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.059.
130. Walski T., Chludzińska L., Komorowska M., Witkiewicz W., *Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells*, Biomed Res Int, 2014, 2014:162102, doi: 10.1155/2014/162102.
131. Walski T., Dąbrowska K., Drohomirecka A., Jędruchiewicz N., Trochanowska-Pauk N., Witkiewicz W., Komorowska M., *The effect of red-to-near-infrared (R/NIR) irradiation on inflammatory processes*, Int J Radiat Biol., 2019, 95(9), 1326-1336, doi: 10.1080/09553002.2019.1625464.
132. Walski T., Drohomirecka A., Bujok J., Czerski A., Wąż G., Trochanowska-Pauk N., Gorczykowski M., Cichoń R., Komorowska M., *Low-level light therapy protects red blood cells against oxidative stress and hemolysis during extracorporeal circulation*, Front Physiol., 2018, 9, 647, doi: 10.3389/fphys.2018.00647.
133. Walski T., Dyrda A., Dzik M., Chludzińska L., Tomków T., Mehl J., Detyna J., Gałęcka K., Witkiewicz W., Komorowska M., *Near infrared light induces post-translational modifications of human red blood cell proteins*, Photochem Photobiol Sci, 2015, 14(11), 2035-2045, doi: 10.1039/c5pp00203f.
134. Walski T., Gałęcka K., Grzeszczuk-Kuć K., Komorowska M., *Modification of the hydrogen bonding network at the reversed micelles interface by near infrared radiation*, Nukleonika, 2013, vol. 58, nr 3, s. 435-438.

135. Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Berlik W., Synal-Kulczak I., Bohara R., Detyna J., Komorowska M., *Effect of near-infrared blood photobiomodulation on red blood cell damage from the extracorporeal circuit during hemodialysis in vitro*, *Photonics*, 2022, 9(5), 341, doi: 10.3390/photonics9050341.
136. Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Gałęcka K., Trochanowska-Pauk N., Bohara R., Czernski A., Szuldrzyński K., Królikowski W., Detyna J., Komorowska M., *Near-infrared photobiomodulation of blood reversibly inhibits platelet reactivity and reduces hemolysis*, *Nature Sci Rep.*, 2022, 12(1), 4042, doi: 10.1038/s41598-022-08053-y.
137. Wasilewska M., Adamczyk Z., *Fibrinogen adsorption on mica studied by AFM and in situ streaming potential measurements*, *Langmuir*, 2011, 27(2), 686–696, doi: 10.1021/la102931a.
138. Wasilewska M., Adamczyk Z., and Jachimska B., *Structure of fibrinogen in electrolyte solutions derived from dynamic light scattering (DLS) and viscosity measurements*, *Langmuir*, 2009, 25, 3698–3704, doi: 10.1021/la803662a.
139. Watala C., Boncer M., Golański J., Koziółkiewicz W., Trojanowski Z., Walkowiak B., *Platelet membrane lipid fluidity and intraplatelet calcium mobilization in type 2 diabetes mellitus*, *European Journal of Haematology*, 1998, 61(5), 319–326, doi: 10.1111/j.1600-0609.1998.tb01095.x.
140. Watala C., Boncler M., Golański J., Koziółkiewicz W., Walkowiak B., Cierniewski C.S., *Release of calcium and P-selectin from intraplatelet granules is hampered by procaine*, *Thromb Res.*, 1999, 94(1), 1-11, doi: 10.1016/s0049-3848(98)00174-1.
141. Watala C., Pietrucha T., Gwoździński K., Kralisz U., Cierniewski C.S., *Microenvironment changes in human blood platelet membranes associated with binding of tissue-type plasminogen activator*, *European Journal of Biochemistry*, 1993, 215(3), 867–871, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18104.x.
142. Wertz C. F., Santore M.M., *Effect of surface hydrophobicity on adsorption and relaxation kinetics of albumin and fibrinogen: Single-species and competitive behavior*, *Langmuir* 2001, 17, 3006–3016, doi: 10.1021/la0017781.
143. White G.C., Scarborough D.E., Brinkhous K.M., *Morphological study of early phases of platelet adhesion to foreign surfaces: effect of calcium*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1983, 416, 351–362, doi: 10.1111/j.1749-6632.1983.tb35198.x.
144. White J.G., *EDTA-induced changes in platelet structure and function: clot retraction*, *Platelets*, 2000, 11(1), 49-55, doi: 10.1080/09537100075805.
145. White J.G., Escolar G., *EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading*, *Platelets*, 2000, 11(1), 56-61, doi: 10.1080/09537100075814.
146. White J.G., Krumwiede M.D., *Influence of intracellular chelating agents on formation of spike-like pseudopods by human platelets*, *Platelets*, 1999, 10(2-3), 159-68, doi: 10.1080/09537109976248.

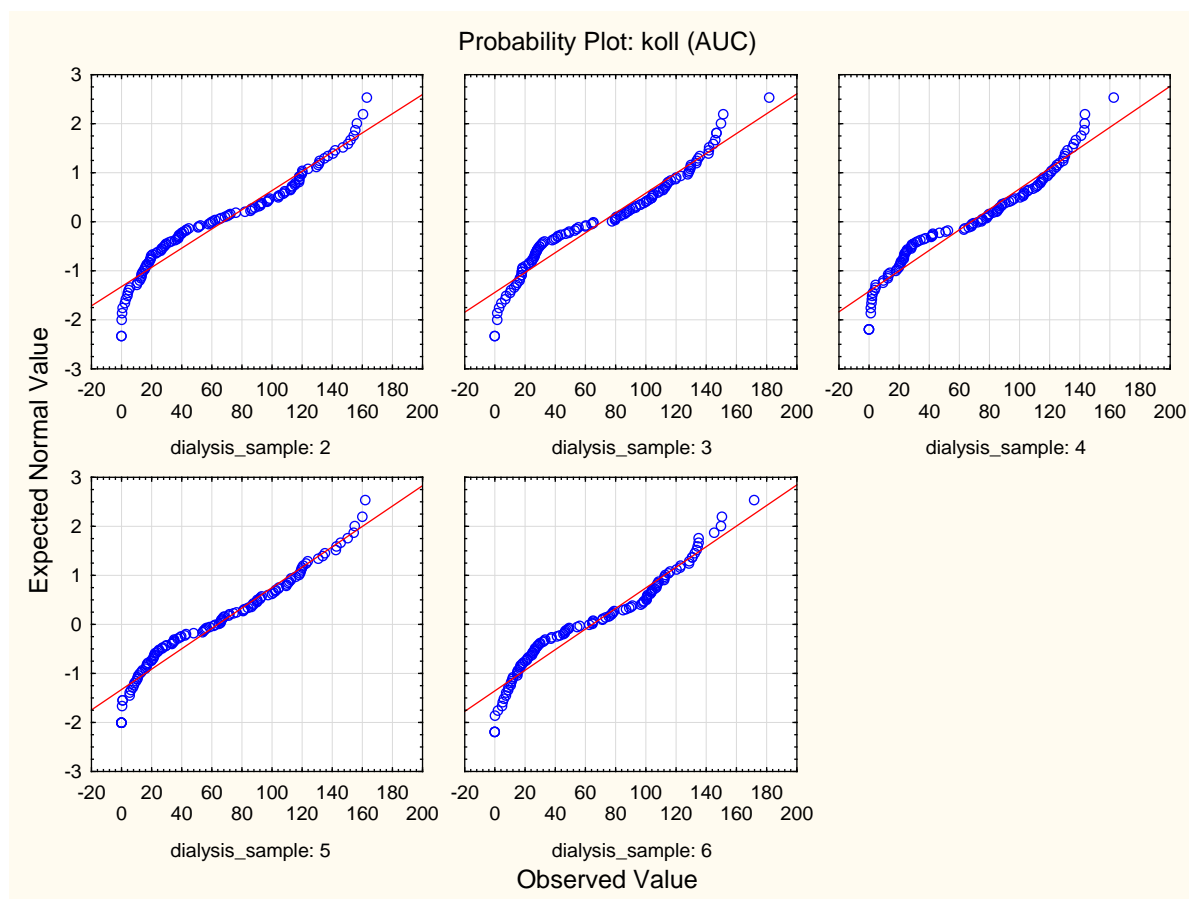
147. Winocour P.D., Watala C., Perry D.W., Kinlough-Rathbone R.L., *Decreased platelet membrane fluidity due to glycation or acetylation of membrane proteins*, *Thrombosis and Haemostasis*, 1992, 68(5), 577–582.
148. Yamaikina, I. V., Malashevich, P. N., Volkova, E. G., Kovkova, A. V., Pashkevich, O. I., Podol'tsev, A. S., *Direct rheological cytometric and cardiological effect of intravenous laser irradiation of blood*, *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2008, Vol. 81, No. 6, 1207–1213, doi: 10.1007/s10891-009-0139-3.
149. Yaseen M., Zhao X., Freund A., Seifalian A.M., Lu J.R., *Surface structural conformations of fibrinogen polypeptides for improved biocompatibility*, *Biomaterials*, 2010, 31, 3781–3792, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.107.
150. Yesman S.S., Mamilov S.O., Veligotsky D.V., Gisbrecht A.I., *Local changes in arterial oxygen saturation induced by visible and near-infrared light radiation*, *Lasers Med Sci.*, 2016, 31(1), 145-9, doi: 10.1007/s10103-015-1838-y.
151. Zalesskaya G.A., Sambor, E.G., *Interaction of low-intensity laser radiation with blood and its components*, *J Appl Spectrosc*, 2005, 72, 242–248, doi: 10.1007/s10812-005-0062-0.
152. Zalesskayaa G.A., Ulashchik V.S., *Molecular mechanisms of photochemotherapy (Review)*, *J Appl Spectrosc*, 2009, 76, 44–65, doi: 10.1007/s10812-009-9151-9.
153. Zheng J-M., Chin W-C., Khijniak E., Khijniak J.E., Pollack G.H., *Surfaces and interfacial water: evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact*, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2006, 127, 19, doi: 10.1016/j.cis.2006.07.002.
154. Zubenko G.S., Kopp U., Seto T., Firestone L.L., *Platelet membrane fluidity individuals at risk for Alzheimer's disease: a comparison of results from fluorescence spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy*, *Psychopharmacology (Berl)*, 1999, 145(2), 175–180, doi: 10.1007/s002130051046.
155. Zucker M.B., Vroman L., *Platelet adhesion induced by fibrinogen adsorbed onto glass*, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1969, 131(2), 318–320, doi: 10.3181/00379727-131-33866.

## Załączniki

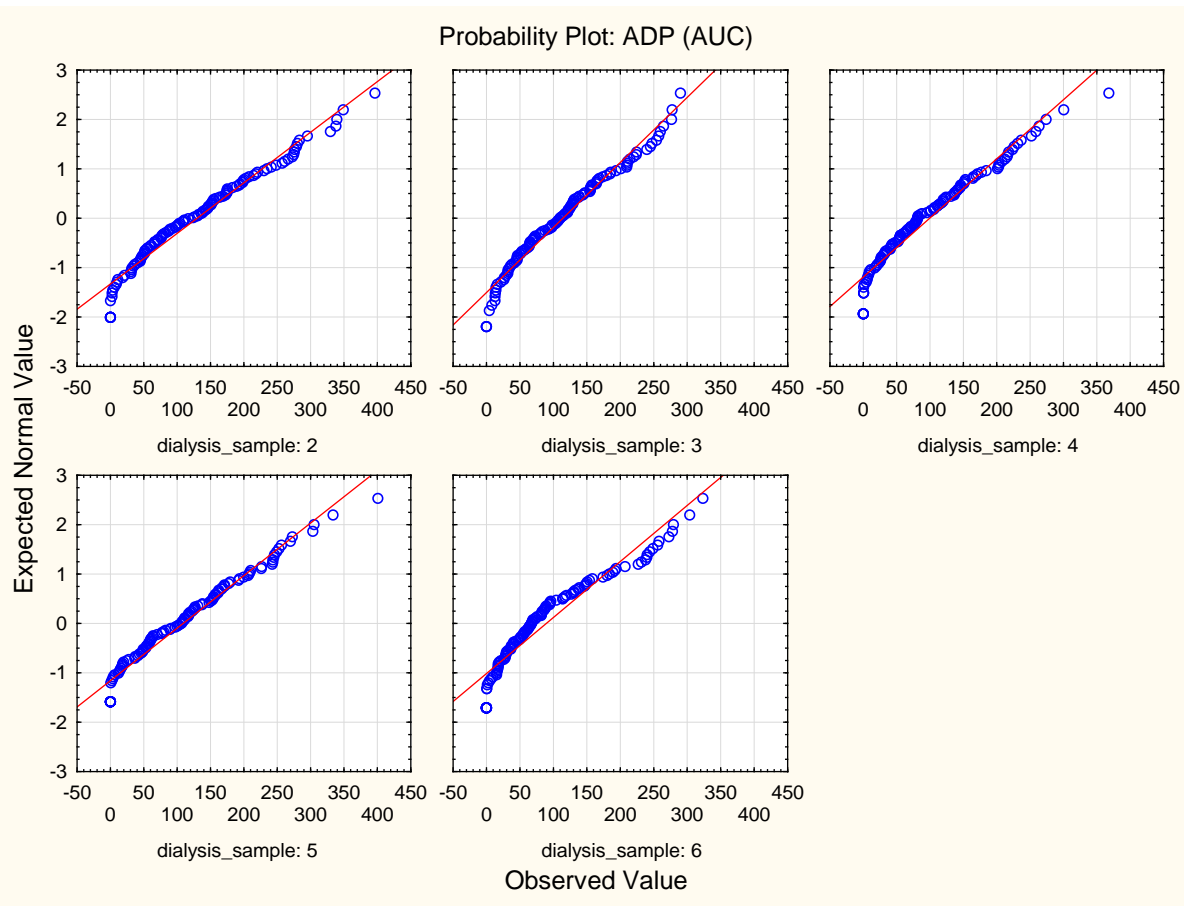
## Załącznik 1

**Analiza zmian zachodzących podczas trwania hemodializy uwzględniająca miejsce i czas pobrania krwi na podstawie wyników wszystkich dializ (10 zabiegów) i bez rozróżnienia na grupę kontrolną i naświetlaną. Założenia testu ANOVA**

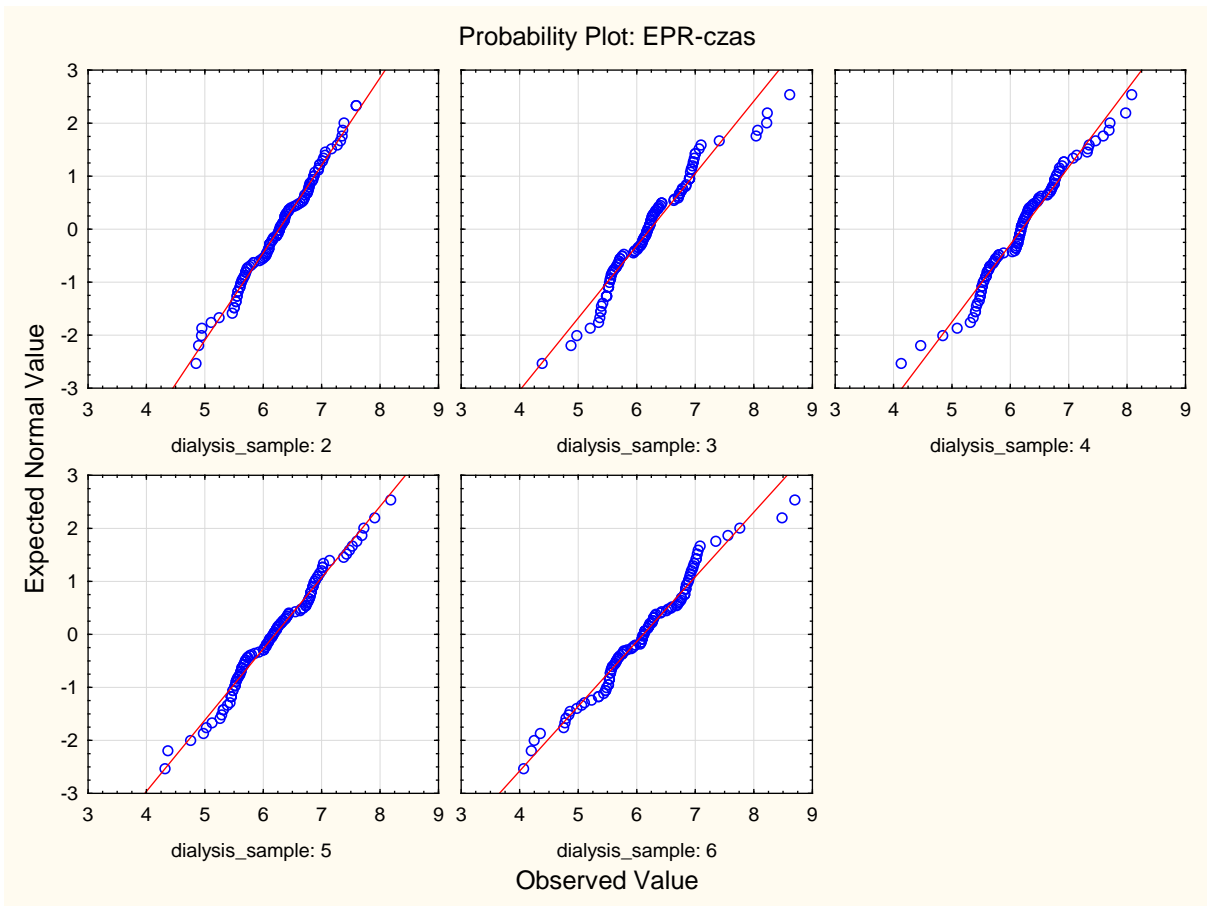
### 1. Ocena normalności rozkładów.



Rys. 1-1. Wykresy normalności dla zmiennej koll (AUC), dla kolejnych punktów pomiarowych.

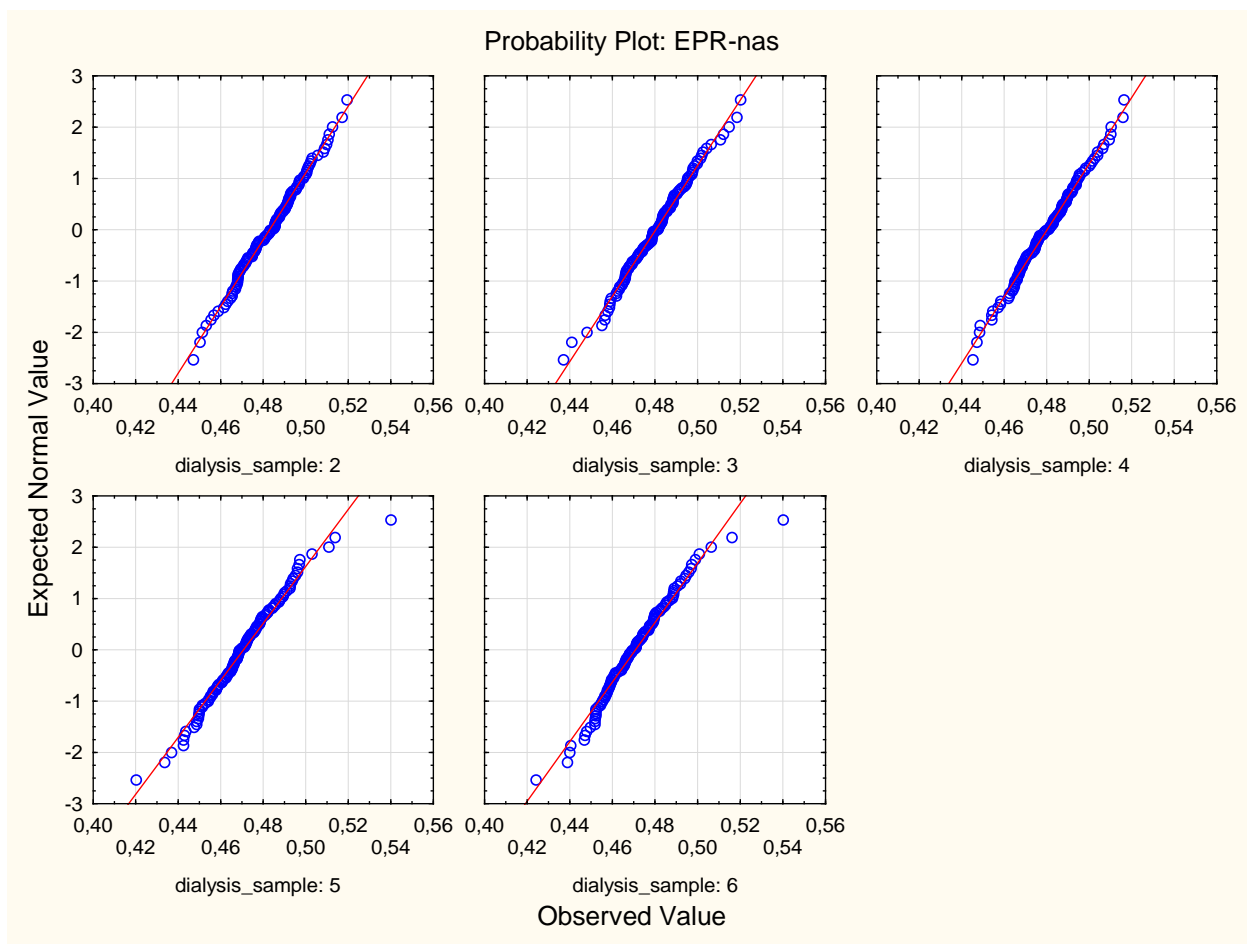


Rys. 1-2. Wykresy normalności dla zmiennej ADP (AUC), dla kolejnych punktów pomiarowych.



Rys. 1-3. Wykresy normalności dla zmiennej EPR-czas, dla kolejnych punktów pomiarowych.





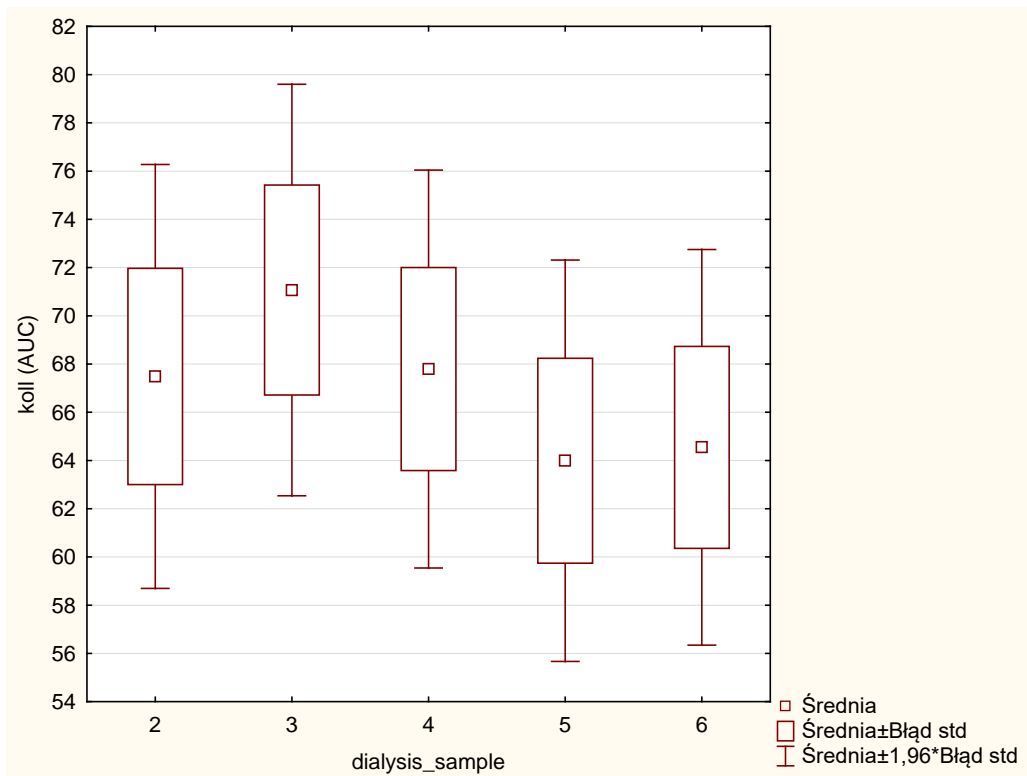
Rys. 1-4. Wykresy normalności dla zmiennej EPR-nas, dla kolejnych punktów pomiarowych.

## 2. Wyniki testu jednorodności wariancji.

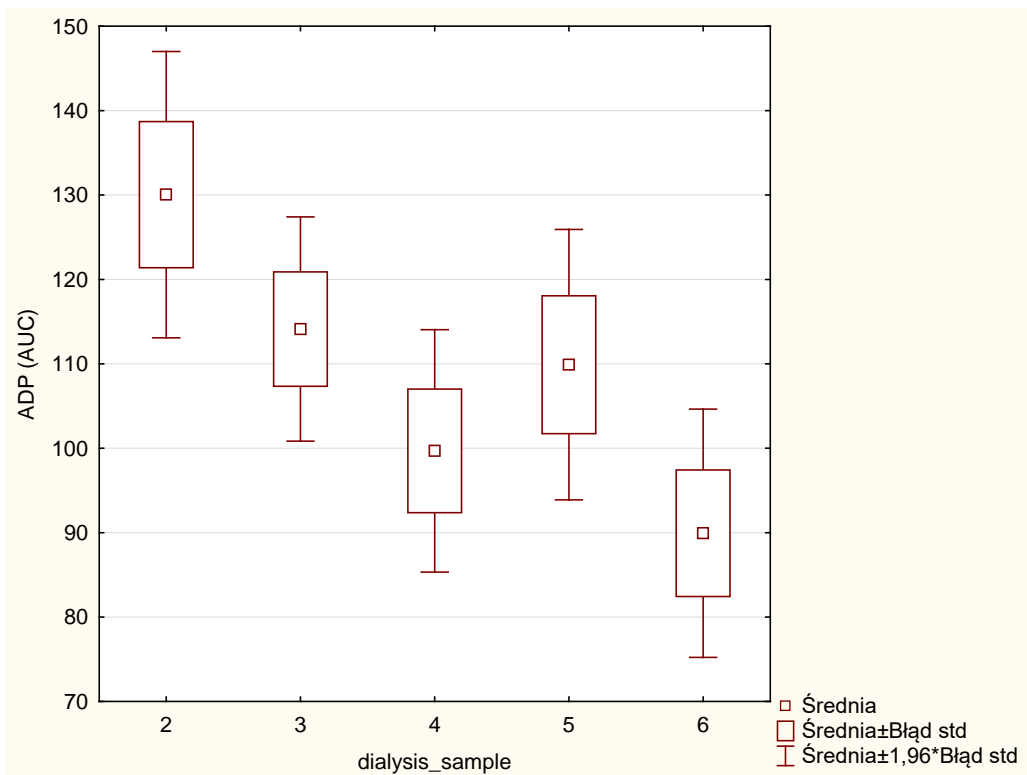
Tab. 1-1. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych.

Zmienna	Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
koll (AUC)	1040,83	4	260,207	268957	585	459,756	0,566	0,687448
ADP (AUC)	22925,48	4	5731,371	1352511	585	2311,985	2,479	0,043039
EPR-czas	1,76	4	0,440	114	585	0,195	2,263	0,061138
EPR-nas	0,00	4	0,000	0	585	0,000	0,271	0,896495

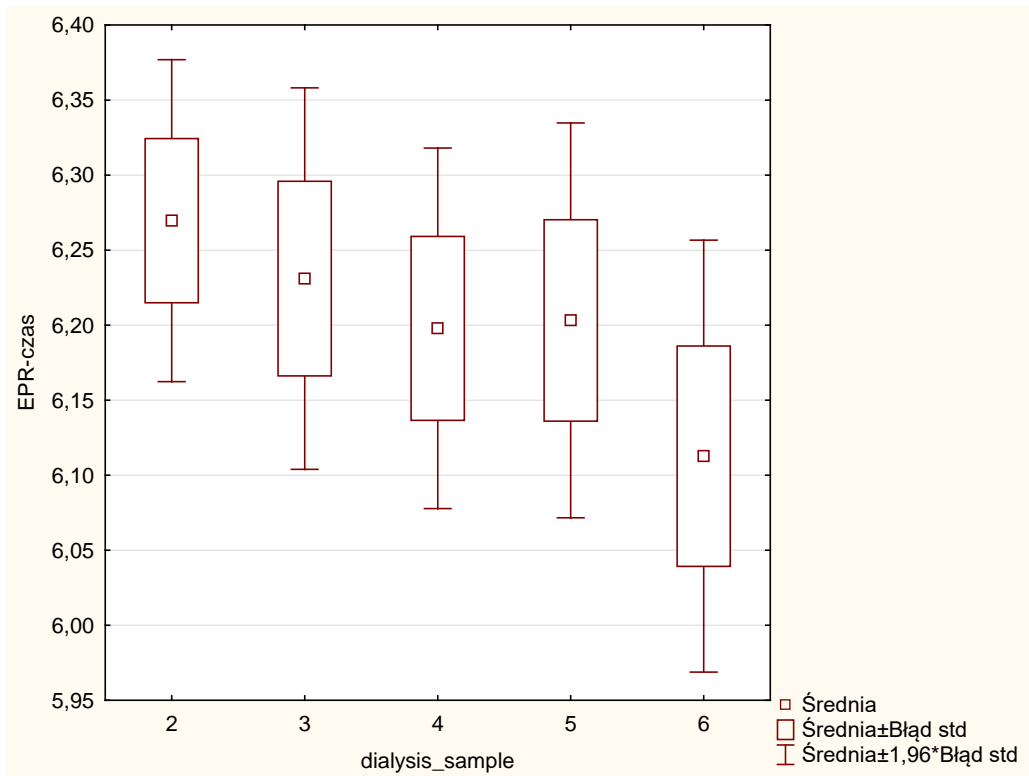
### 3. Wykresy typu box-plot



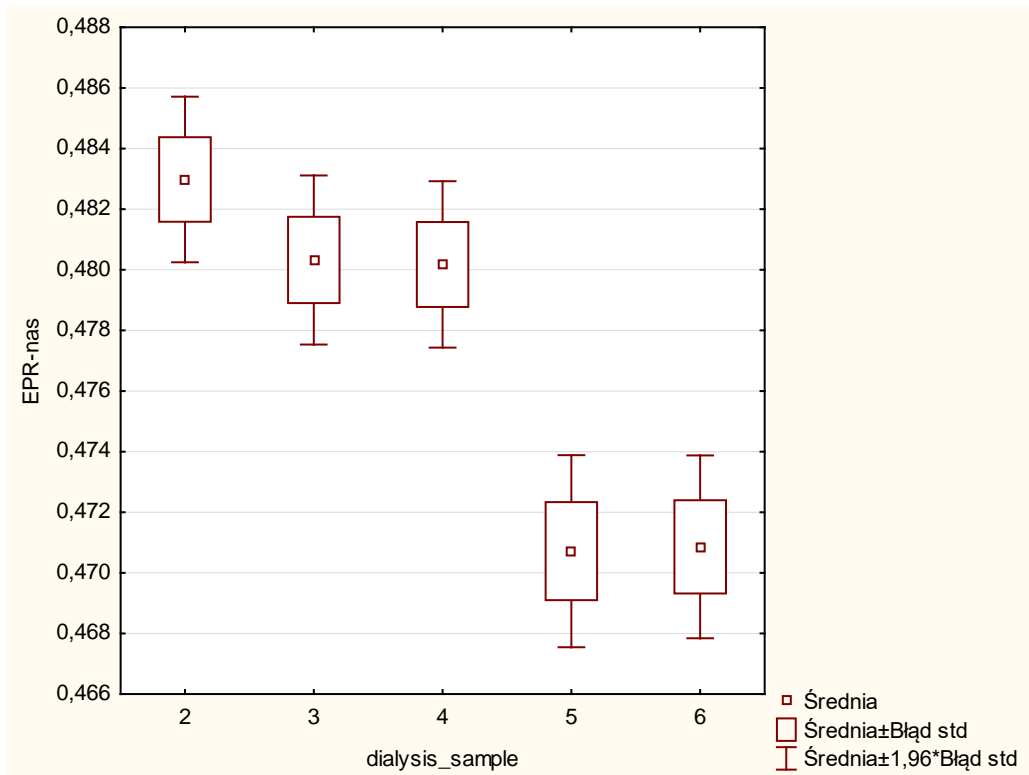
Rys. 1-5. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie.



Rys. 1-6. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie.



Rys. 1-7. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-czas w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie.



Rys. 1-8. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do poszczególnych punktów pomiarowych w dializie.

## Załącznik 2

**Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną występujących w trakcie pojedynczej dializy (zmiany w czasie) na podstawie wyników wszystkich 10 zabiegów z uwzględnieniem miejsca pobrania krwi, oddzielnie przed (B) i za (A) dializatorem. Materiał uzupełniający**

### 1. Ocena jednorodności wariancji.

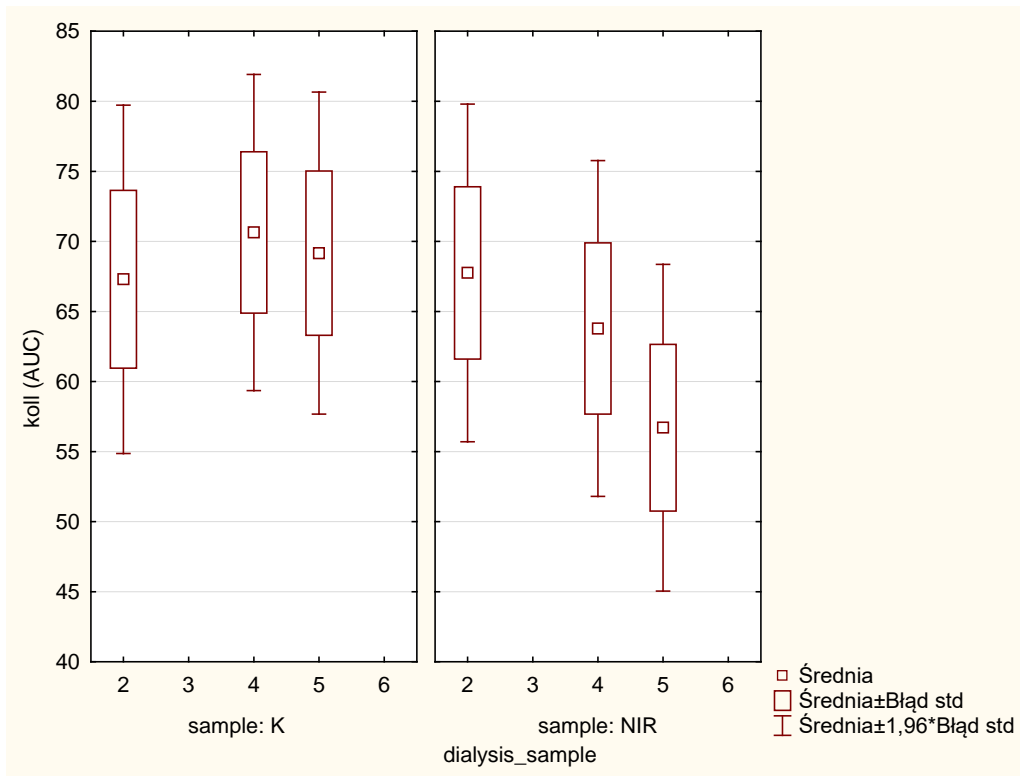
Tab. 2-1. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych. Próbkę pobrane **przed dializatorem**

Zmienna	B/A=B Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
koll (AUC)	7414,89	5	1482,977	162147,0	348	465,940	3,182766	0,007992
ADP (AUC)	37959,13	5	7591,827	825574,2	348	2372,340	3,200143	0,007720
EPR-czas	1,68	5	0,336	58,8	348	0,169	1,987526	0,079884
EPR-nas	0,00	5	0,000	0,0	348	0,000	0,863724	0,505631

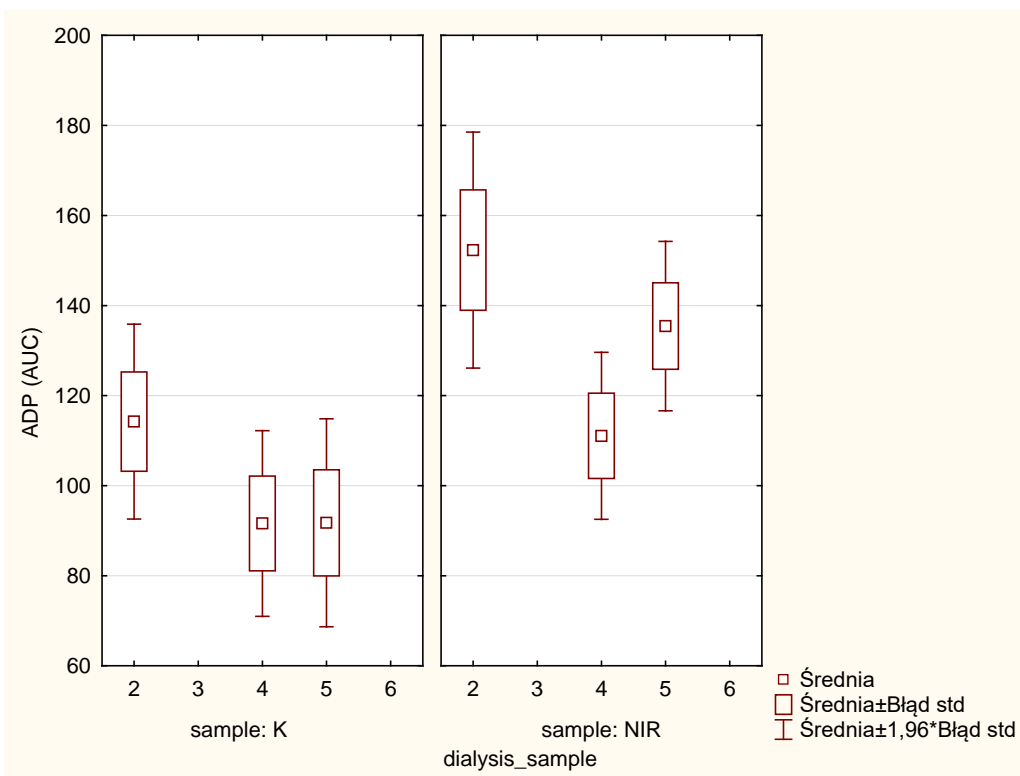
Tab. 2-2. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych. Próbkę pobrane **za dializatorem**

Zmienna	B/A=A Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p
koll (AUC)	2772,987	3	924,329	103108,7	232	444,434	2,079789	0,103619
ADP (AUC)	5919,561	3	1973,187	452810,9	232	1951,771	1,010973	0,388592
EPR-czas	1,677	3	0,559	52,6	232	0,227	2,467306	0,062872
EPR-nas	0,000	3	0,000	0,0	232	0,000	0,267435	0,848835

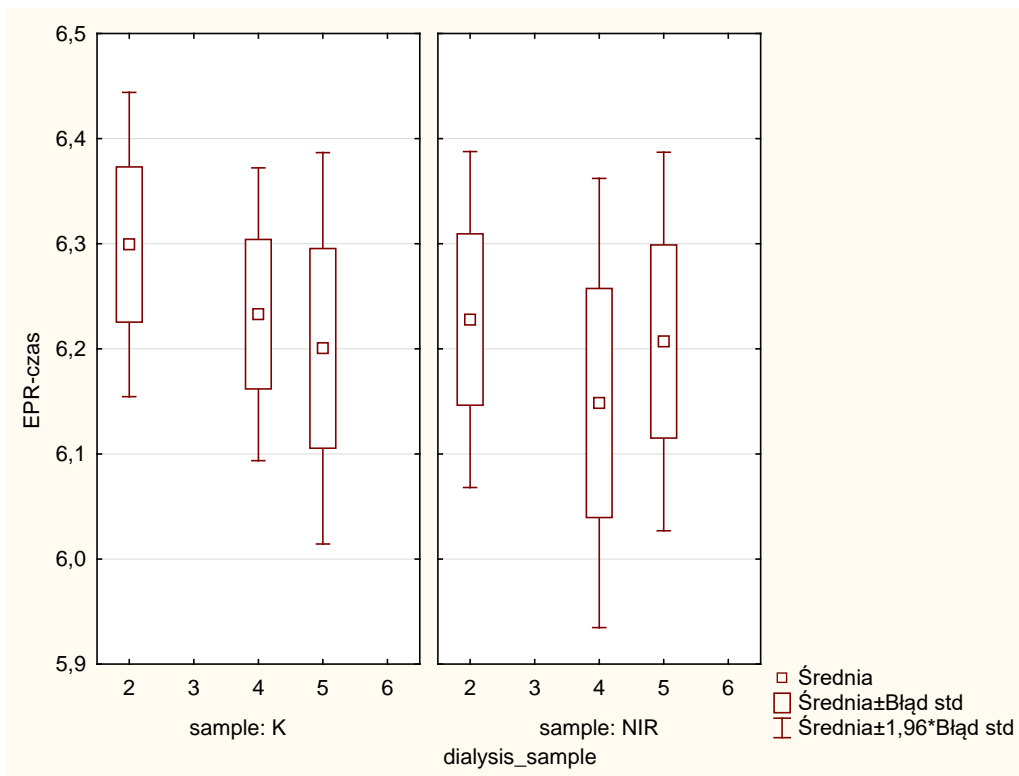
2. Wykresy typu box-plot dla badanych zmiennych. Próbkę przed dializatorem.



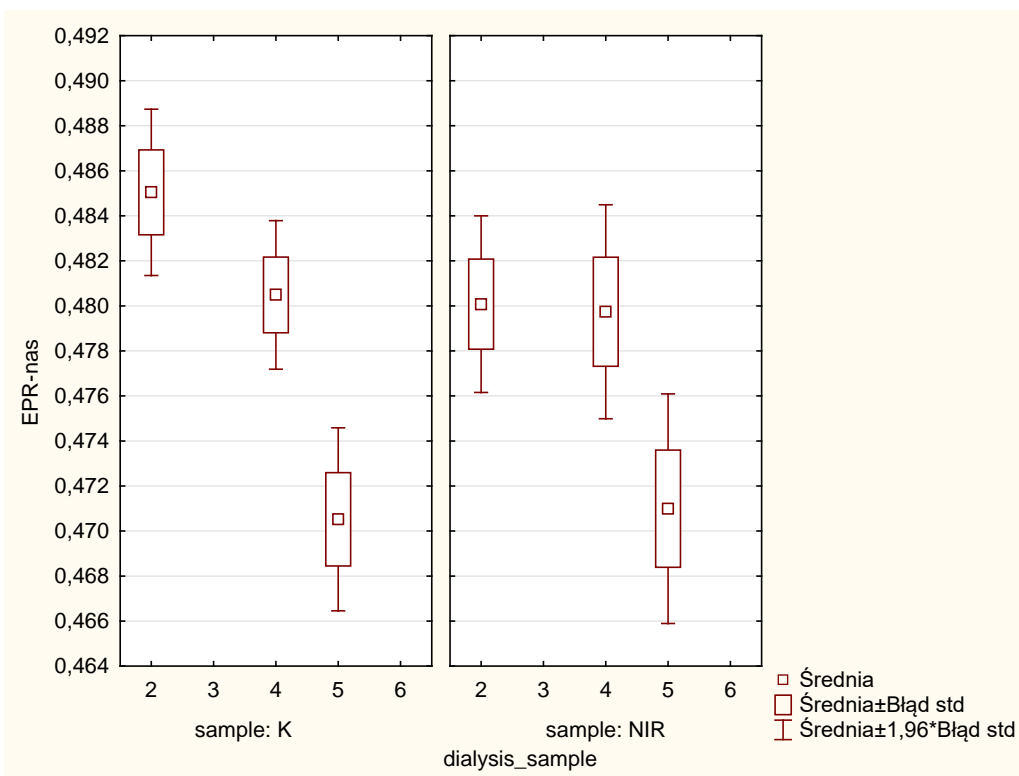
Rys. 2-1. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbkę pobrana **przed dializatorem** (B).



Rys. 2-2. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbkę pobrana **przed dializatorem** (B).

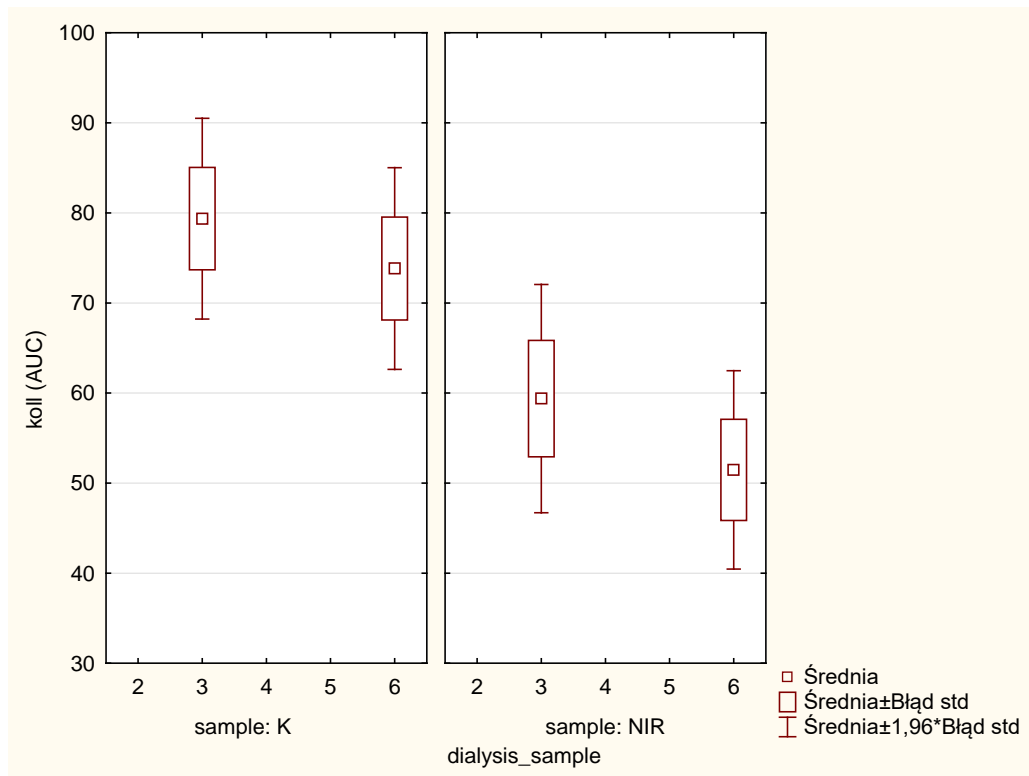


Rys. 2-3. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-czas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbkę pobrana **przed dializatorem** (B).

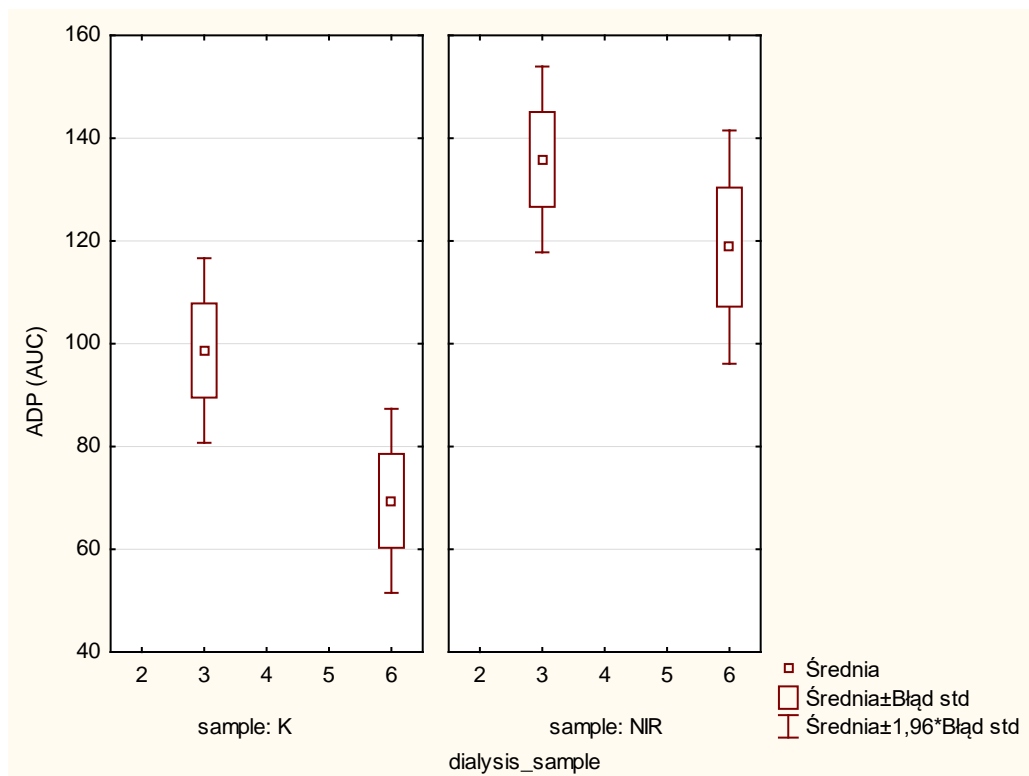


Rys. 2-4. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbkę pobrana **przed dializatorem** (B).

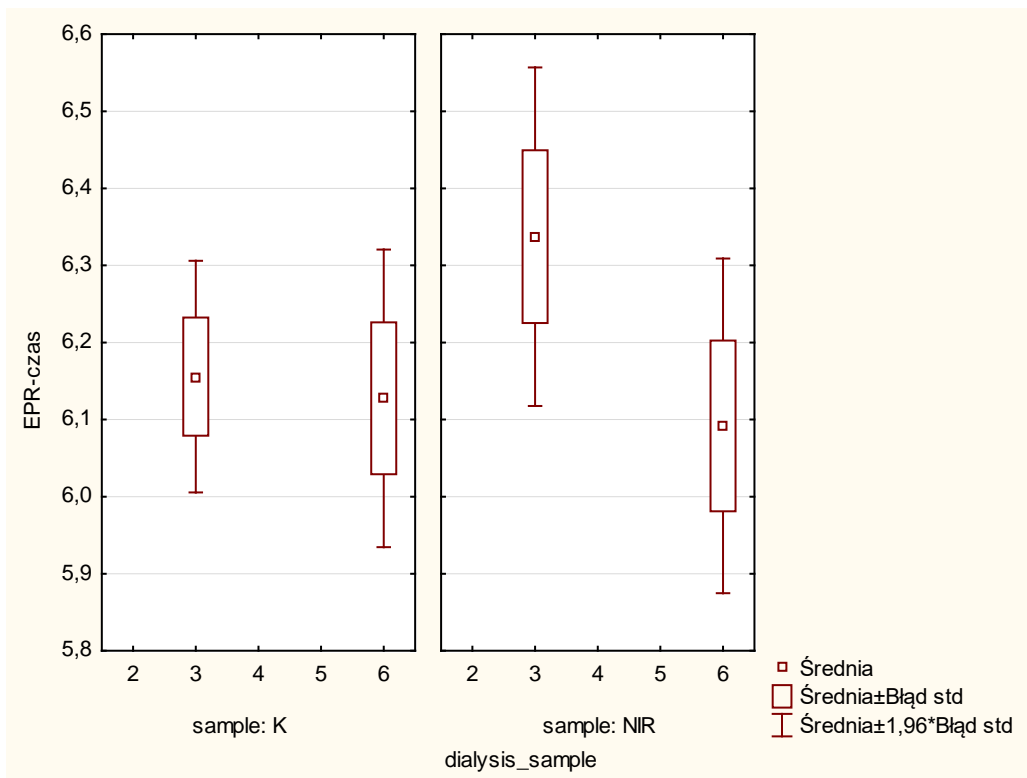
3. Wykresy typu box-plot dla badanych zmiennych. Próbką za dializatorem.



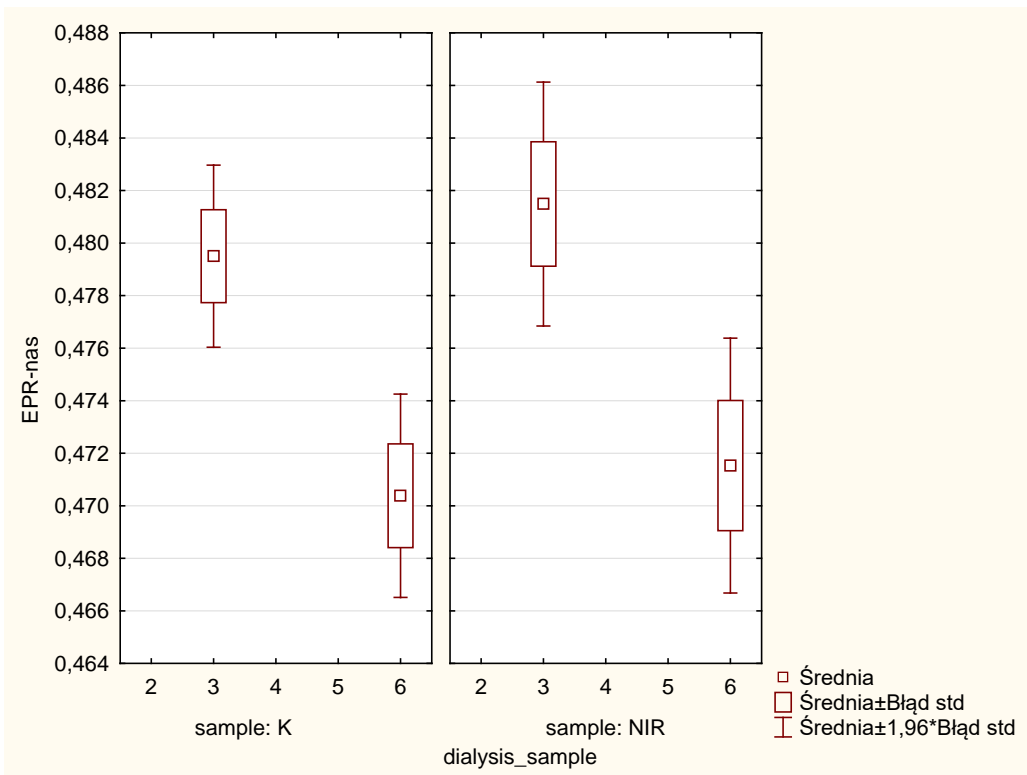
Rys. 2-5. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **za dializatorem** (A).



Rys. 2-6. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **za dializatorem** (A).



Rys. 2-7. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-czas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **za dializatorem** (B).



Rys. 2-8. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych punktów pomiarowych w dializie. Próbką pobrana **za dializatorem** (B).



#### 4. Wyniki testu post-hoc

Tab. 2-3. Wyniki testu post-hoc Tukeya dla zmiennej EPR-nas. Czynniki: K/NIR; punkty pomiarowe podczas dializy. Próbką pobrana **przed dializatorem**

sample dialysis_sample	B/A=B Tukey HSD test; Zmienna: EPR-nas. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=,4850	M=0,000	M=,480	M=,4705	M=0,000	M=,4800	M=0,000	M=,4797	M=,4709	M=0,000
K 2 {1}			0,551508	0,000022		0,558993		0,483995	0,000057	
K 3 {2}										
K 4 {3}	0,551508			0,003501		0,999993		0,999869	0,018846	
K 5 {4}	0,000022		0,003501			0,017593		0,025151	0,999986	
K 6 {5}										
NIR 2 {6}	0,558993		0,999993	0,017593				0,999998	0,056244	
NIR 3 {7}										
NIR 4 {8}	0,483995		0,999869	0,025151		0,999998			0,074537	
NIR 5 {9}	0,000057		0,018846	0,999986		0,056244		0,074537		
NIR 6 {10}										

Tab. 2-4. Wyniki testu post-hoc Tukeya dla zmiennej EPR-nas. Czynniki: K/NIR; punkty pomiarowe podczas dializy. Próbką pobrana **za dializatorem**

sample dialysis_sample	B/A=A Tukey HSD test; Zmienna: EPR-nas. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$									
	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
	M=0,000	M=,4795	M=0,000	M=0,000	M=,4703	M=0,000	M=,4814	M=0,000	M=0,000	M=,4715
K 2 {1}										
K 3 {2}					0,005075		0,912708			0,041231
K 4 {3}										
K 5 {4}										
K 6 {5}		0,005075					0,001351			0,981228
NIR 2 {6}										
NIR 3 {7}		0,912708			0,001351					0,012246
NIR 4 {8}										
NIR 5 {9}										
NIR 6 {10}		0,041231			0,981228		0,012246			

### Załącznik 3

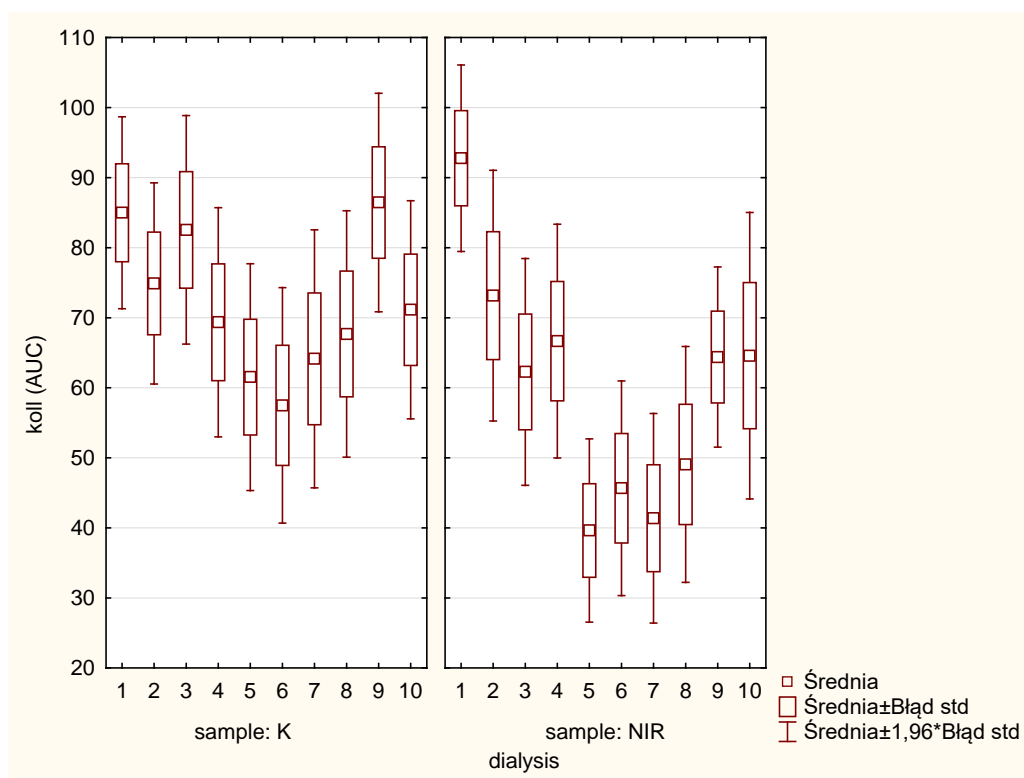
**Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną występujących w wraz z prowadzeniem kolejnych dializ (zmiany w czasie od 1. do 10. zabiegu) na podstawie wyników otrzymanych w poszczególnych sesjach niezależnie od czasu i miejsca pobrania krwi (łącznie przed (B) i za (A) dializatorem). Materiał uzupełniający.**

#### 1. Ocena jednorodności wariancji.

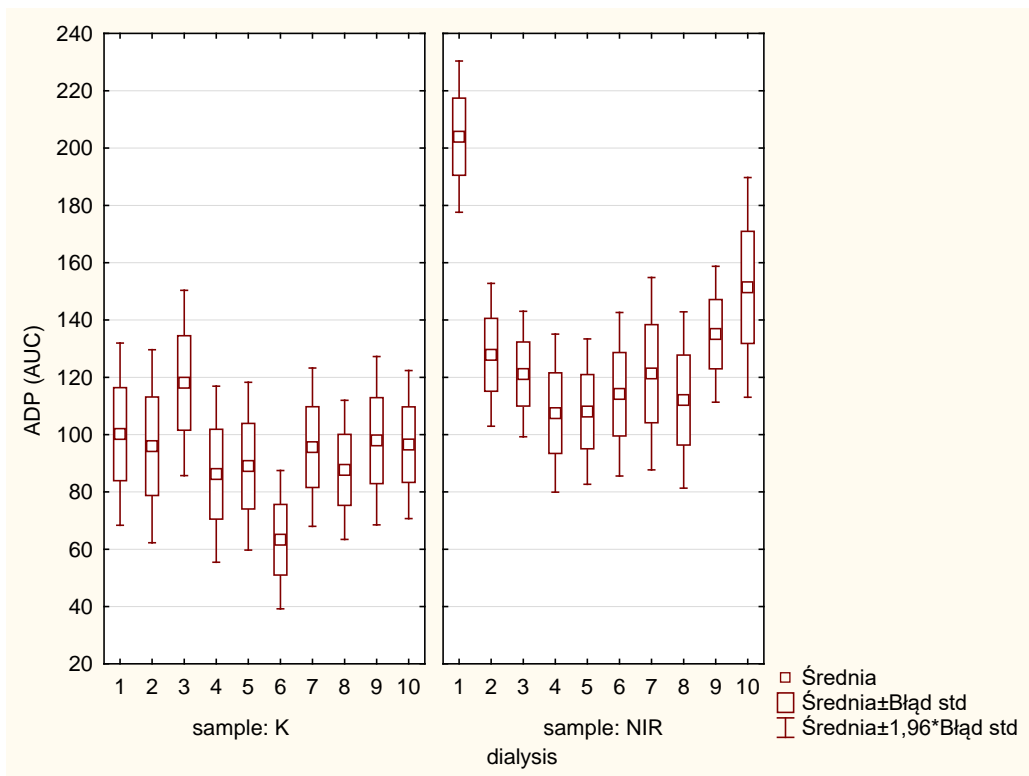
Tab. 3-1. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych.

Zmienna	Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	25256,00	19	1329,263	260394	570	456,831	2,910	0,000039
ADP (AUC)	88408,36	19	4653,072	1209137	570	2121,293	2,194	0,002552
EPR-czas	3,96	19	0,208	103	570	0,181	1,152	0,294221
EPR-nas	0,00	19	0,000	0	570	0,000	2,326	0,001221

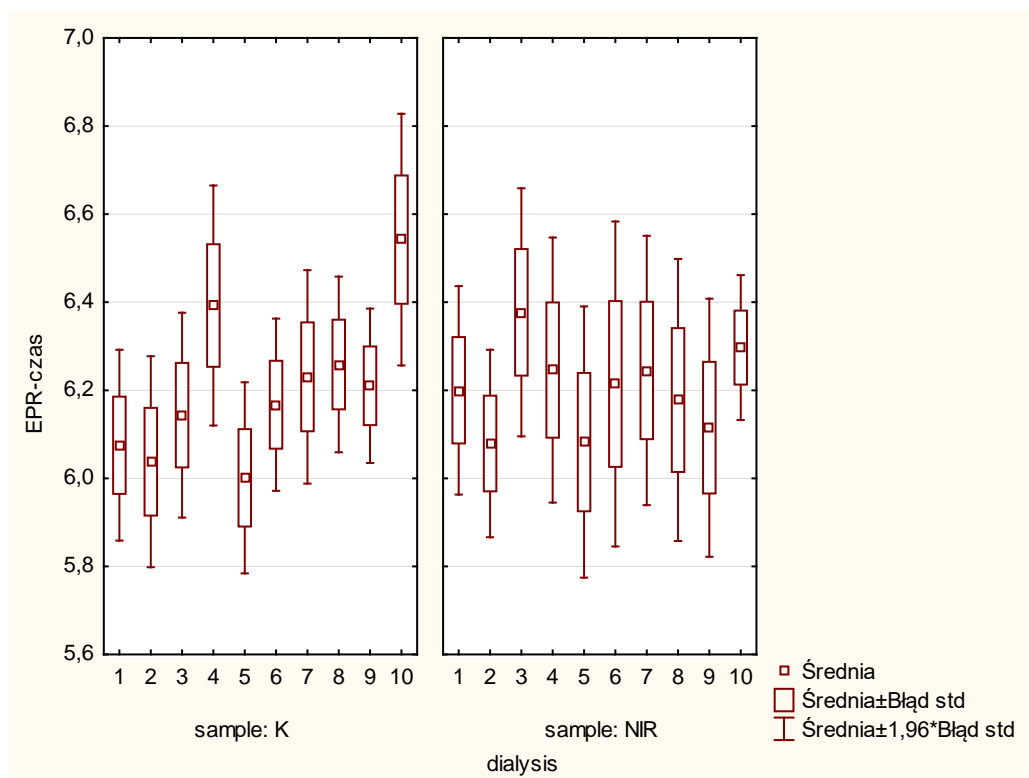
#### 2. Wykresy typu box-plot.



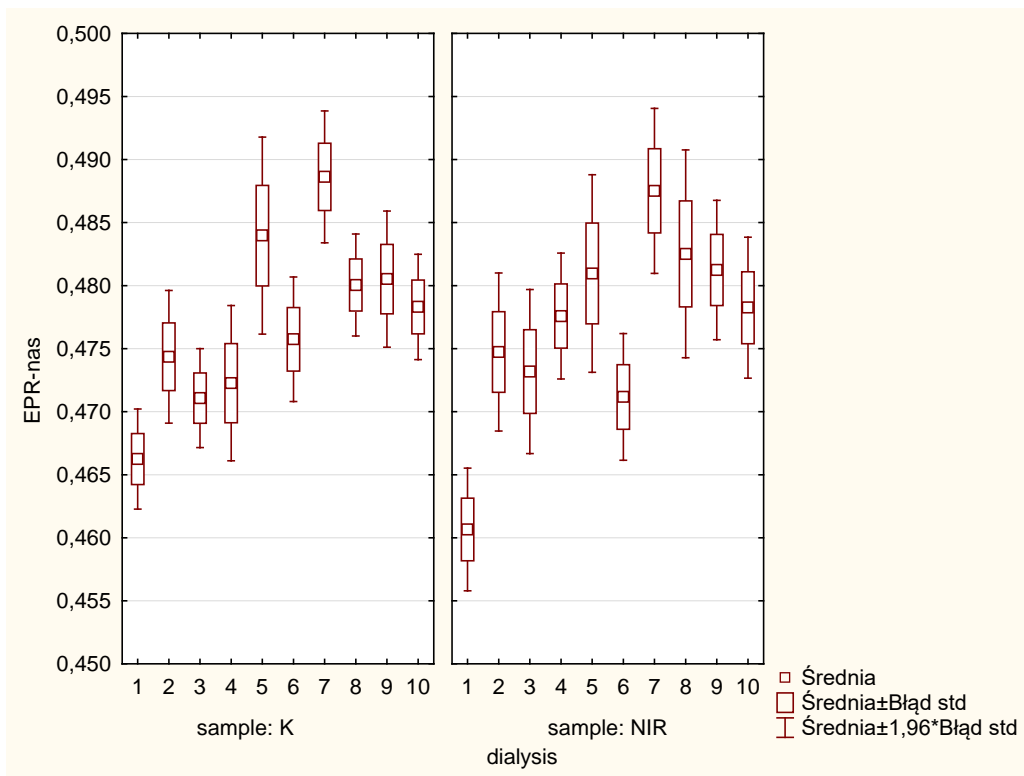
Rys. 3-1. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.



Rys. 3-2. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.



Rys. 3-3. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-czas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.



Rys. 3-4. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K/NIR oraz poszczególnych dializ.

## Załącznik 4

**Analiza różnic między grupą kontrolną i naświetlaną w przebiegu zmian zachodzących wraz prowadzeniem kolejnych dializ (zmiany w czasie od 1. do 10. zabiegu) w zależności od miejsca pobrania krwi, oddzielnie przed (B) i za (A) dializatorem. Materiał uzupełniający.**

### 1. Ocena jednorodności wariancji.

Tab. 4-1. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych. Próba **kontrolna, pobrana przed dializatorem**

Zmienna	B/A=B, sample=K Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	6126,02	9	680,669	100772,3	197	511,535	1,331	0,223037
ADP (AUC)	21174,64	9	2352,738	503967,3	197	2558,210	0,920	0,509076
EPR-czas	0,55	9	0,062	31,9	197	0,162	0,381	0,943252
EPR-nas	0,00	9	0,000	0,0	197	0,000	1,614	0,113326

Tab. 4-2. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych. Próba **NIR, pobrana przed dializatorem**

Zmienna	B/A=B, sample=NIR Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	6192,07	9	688,008	52850,6	137	385,770	1,783	0,076656
ADP (AUC)	18099,53	9	2011,058	247871,5	137	1809,281	1,112	0,358728
EPR-czas	0,99	9	0,110	22,1	137	0,161	0,685	0,721435
EPR-nas	0,00	9	0,000	0,0	137	0,000	0,971	0,466499

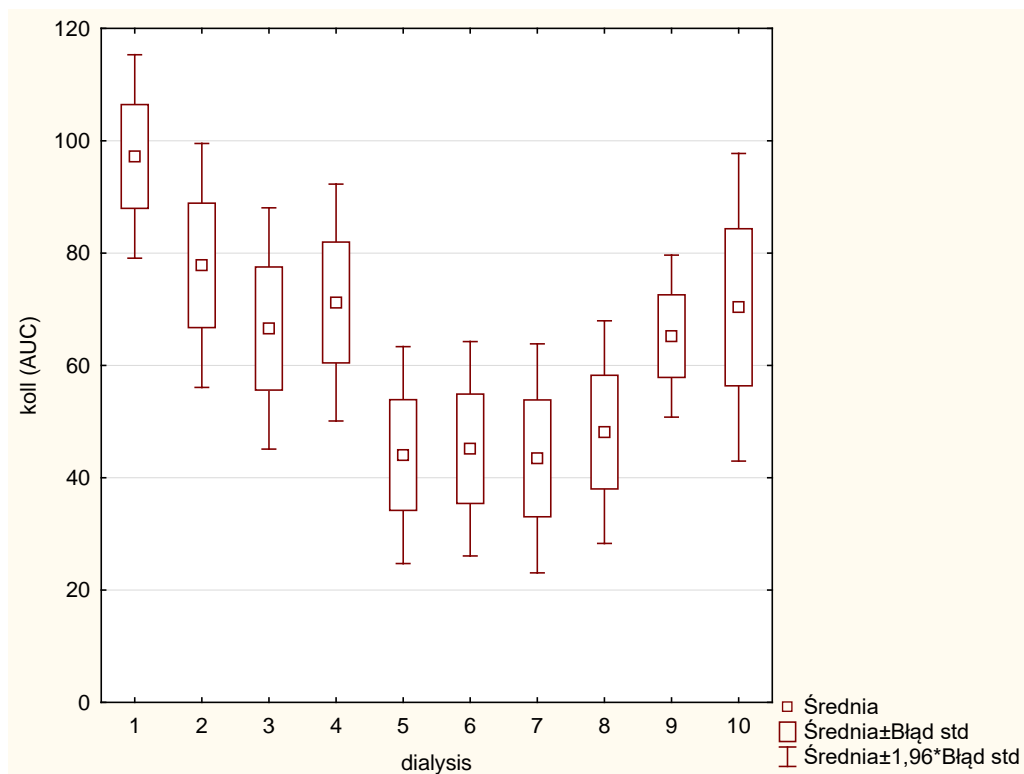
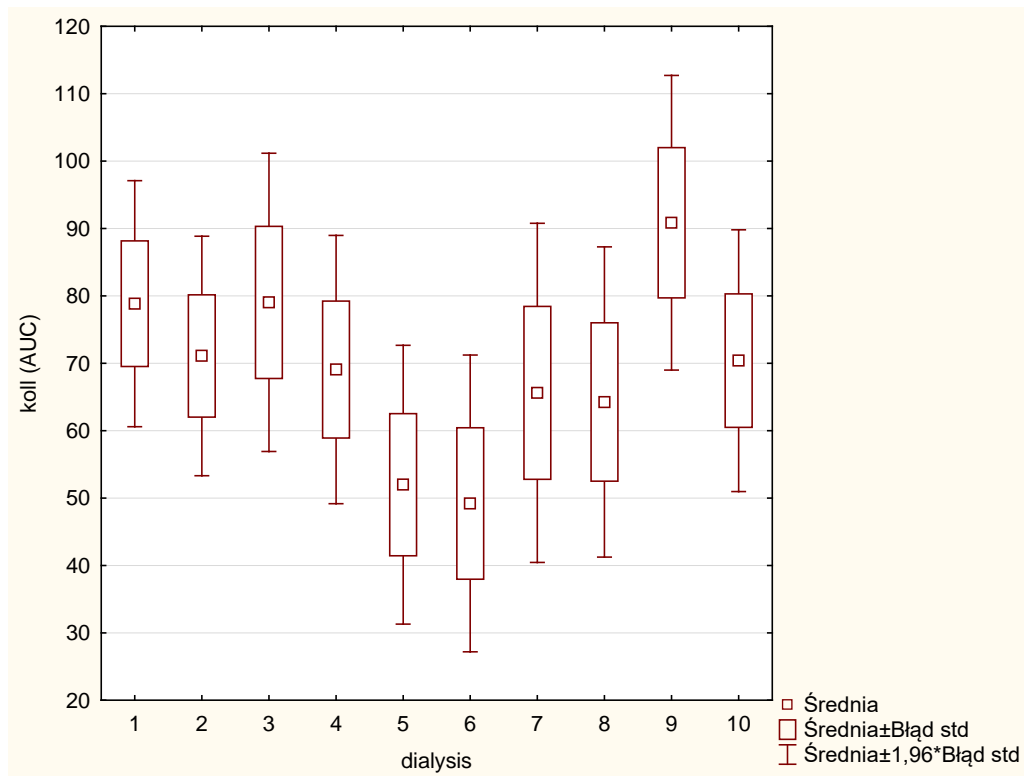
Tab. 4-3. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych. Próba **kontrolna, pobrana za dializatorem**

Zmienna	B/A=A, sample=K Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	2640,44	9	293,382	66187,3	128	517,088	0,567	0,821700
ADP (AUC)	11769,07	9	1307,675	297902,8	128	2327,365	0,562	0,826063
EPR-czas	1,58	9	0,176	24,3	128	0,190	0,925	0,505581
EPR-nas	0,00	9	0,000	0,0	128	0,000	1,479	0,162399

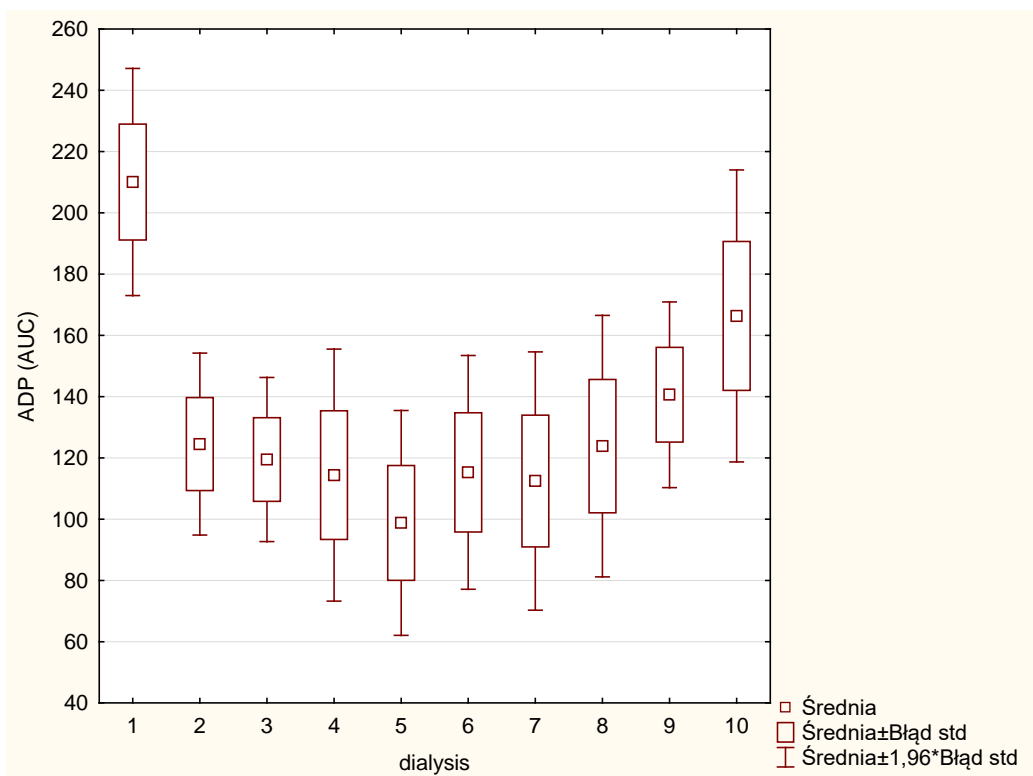
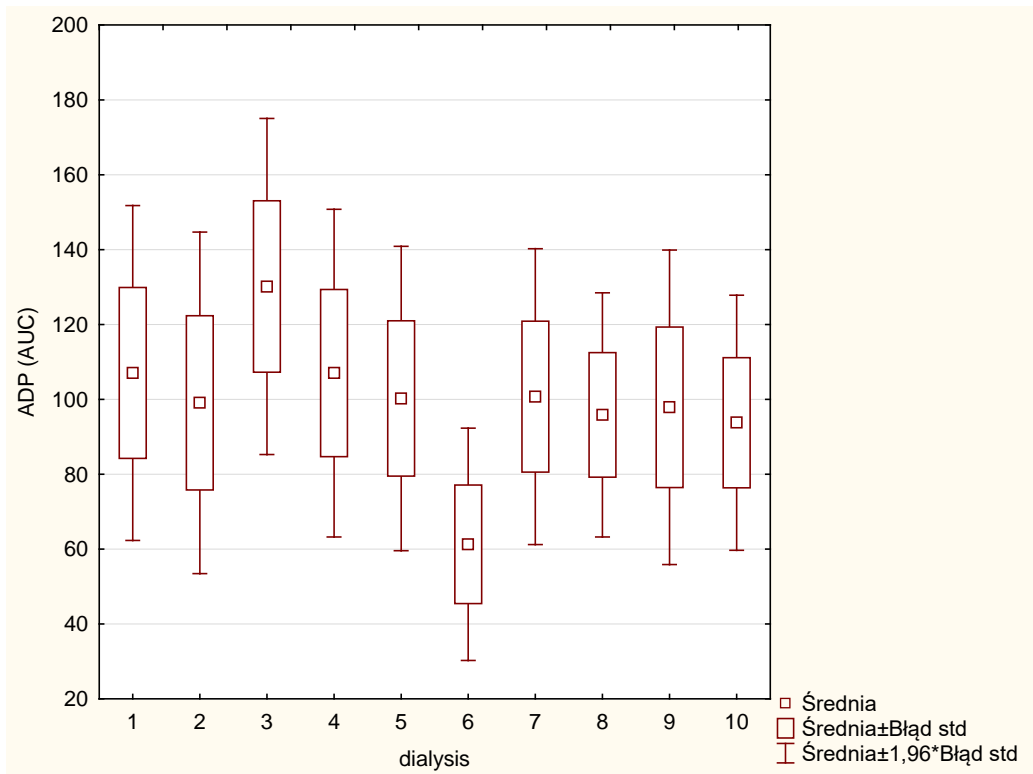
Tab. 4-4. Wyniki testu jednorodności wariancji Levene'a dla badanych zmiennych. Próba **NIR, pobrana za dializatorem**

Zmienna	B/A=A, sample=NIR Test Levene'a jednorodności wariancji. Zaznaczone efekty są istotne dla $p < ,05$							
	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
koll (AUC)	5900,72	9	655,635	35509,7	88	403,520	1,625	0,120429
ADP (AUC)	28365,11	9	3151,679	113387,7	88	1288,496	2,446	0,015560
EPR-czas	3,34	9	0,371	19,4	88	0,221	1,682	0,105166
EPR-nas	0,00	9	0,000	0,0	88	0,000	1,858	0,068861

2. Wykresy typu box-plot dla badanych zmiennych.

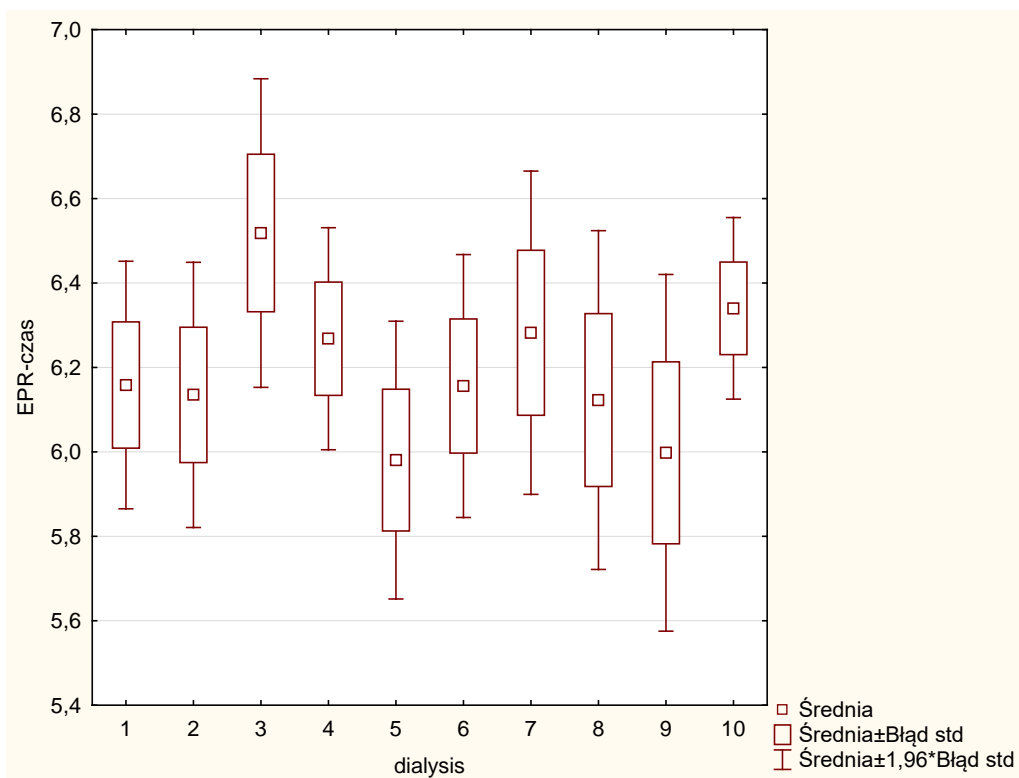
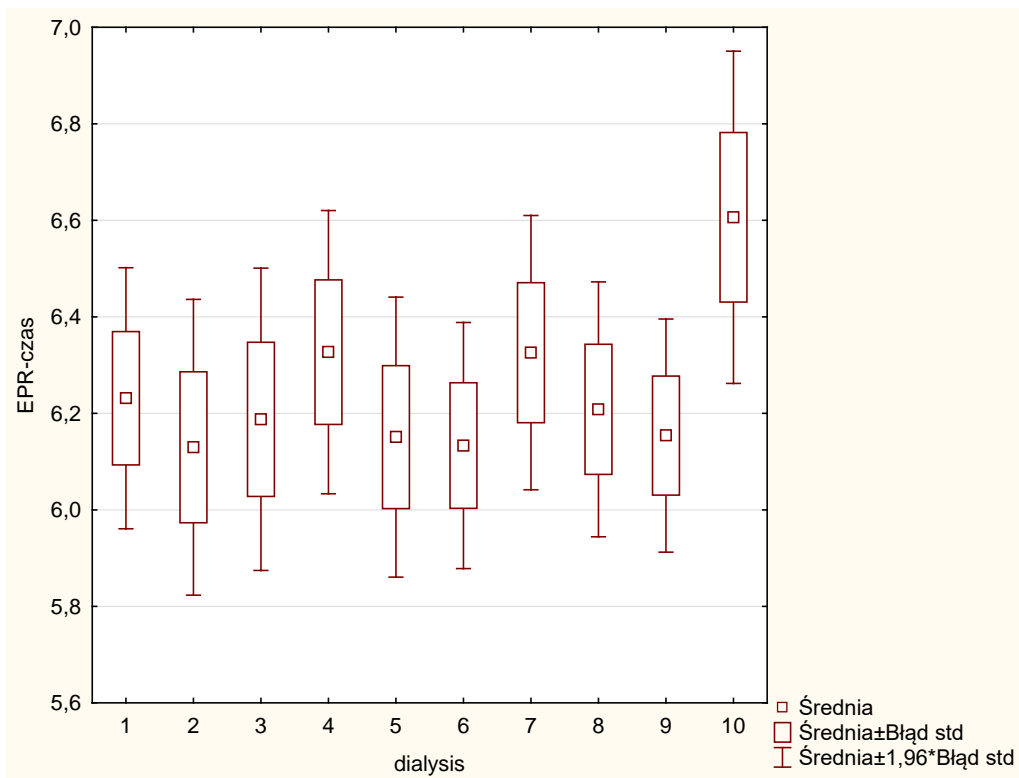


Rys. 4-1. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **przed dializatorem**

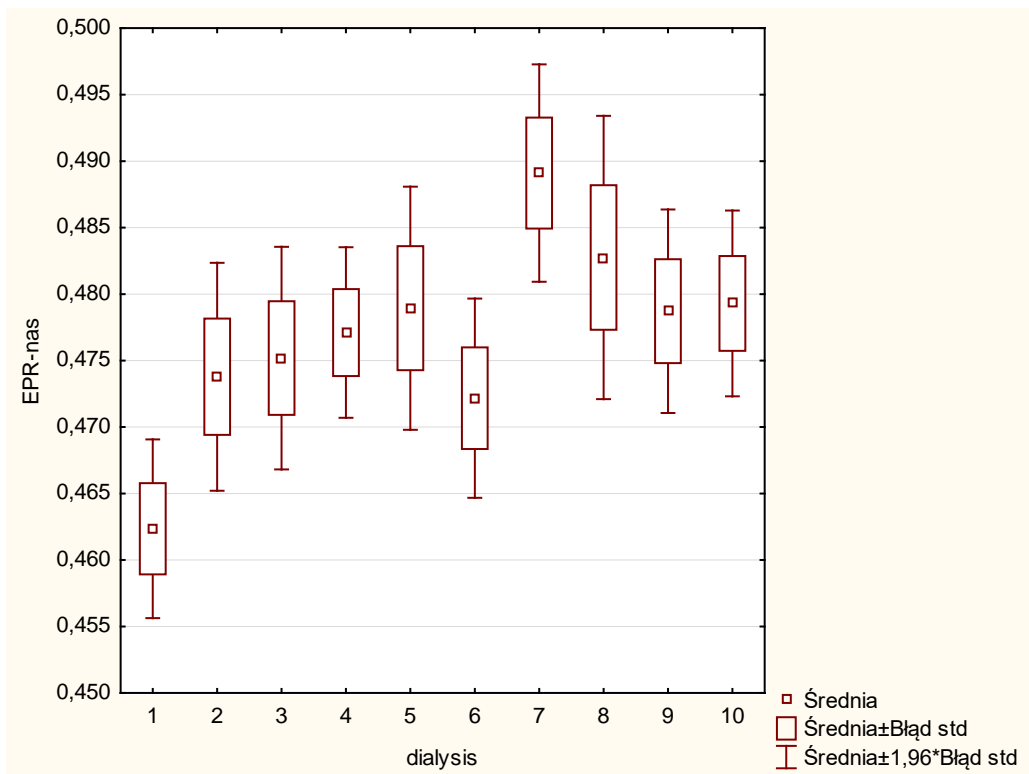
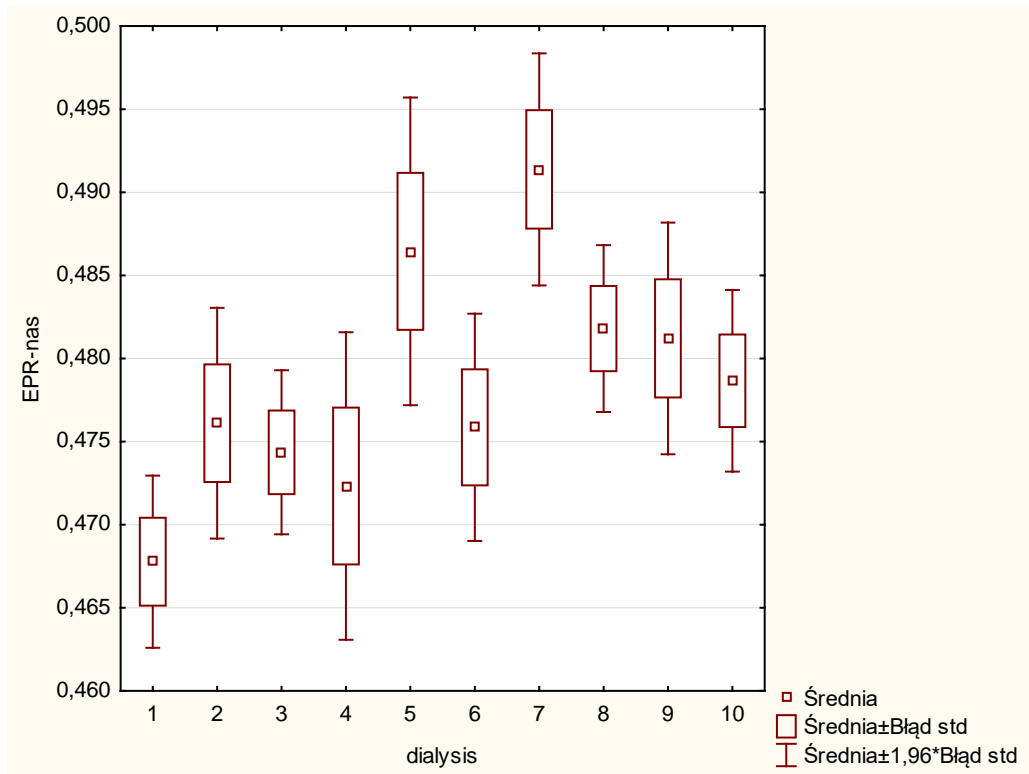


Rys. 4-2. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbkę pobrana **przed dializatorem**

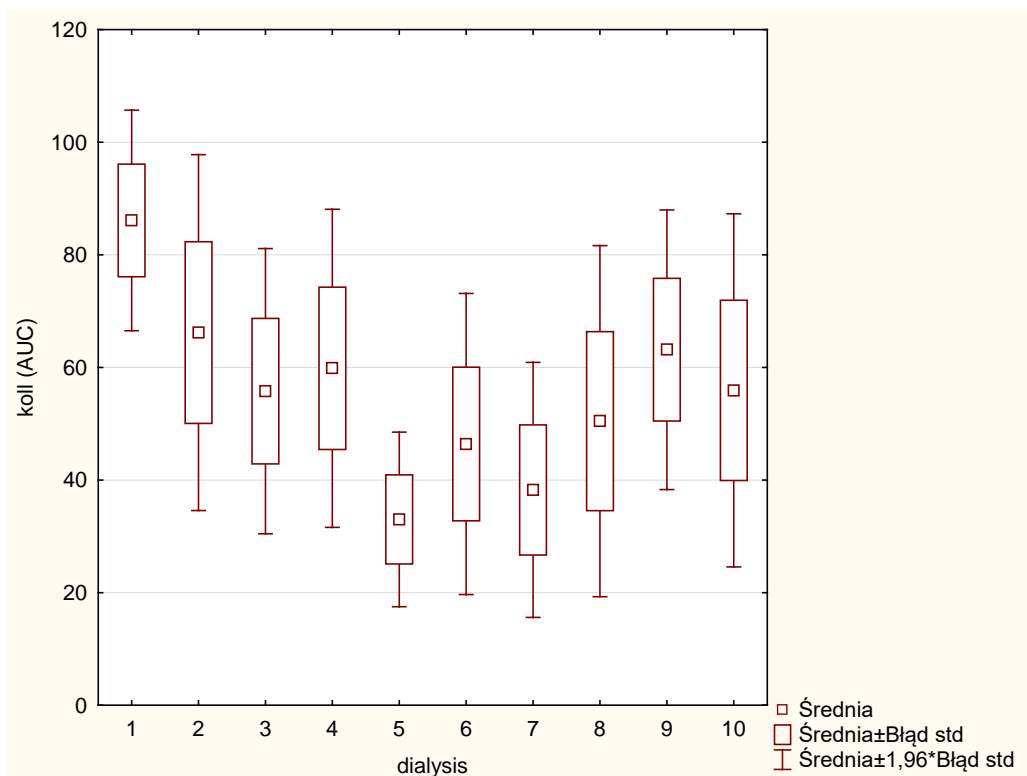
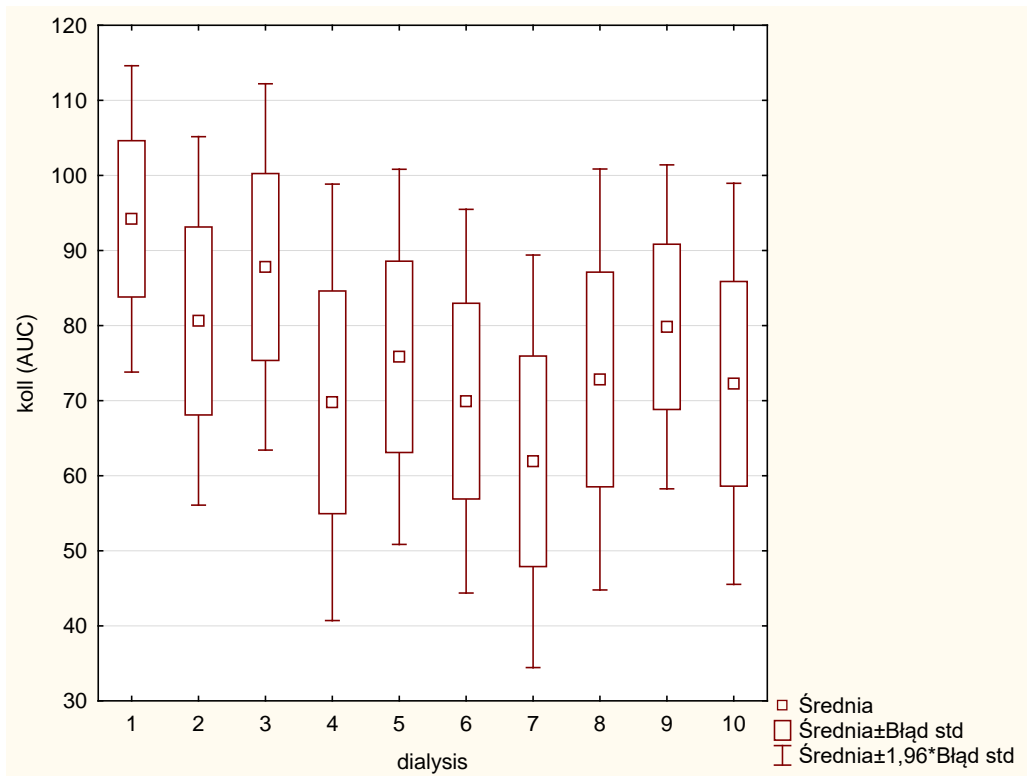




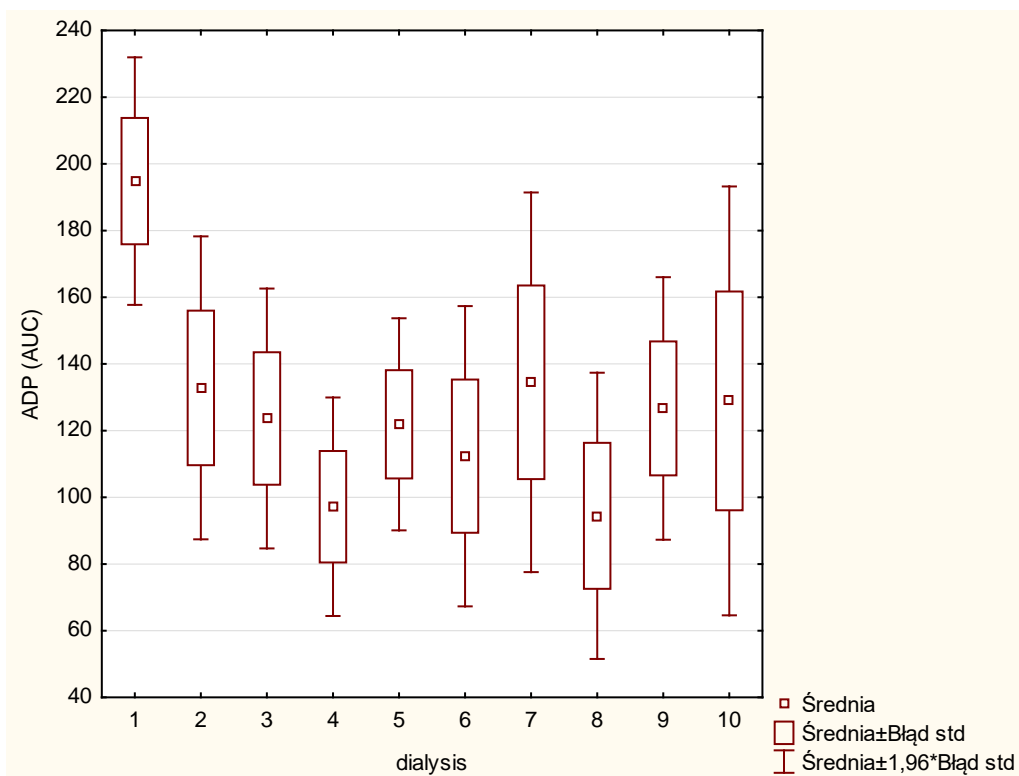
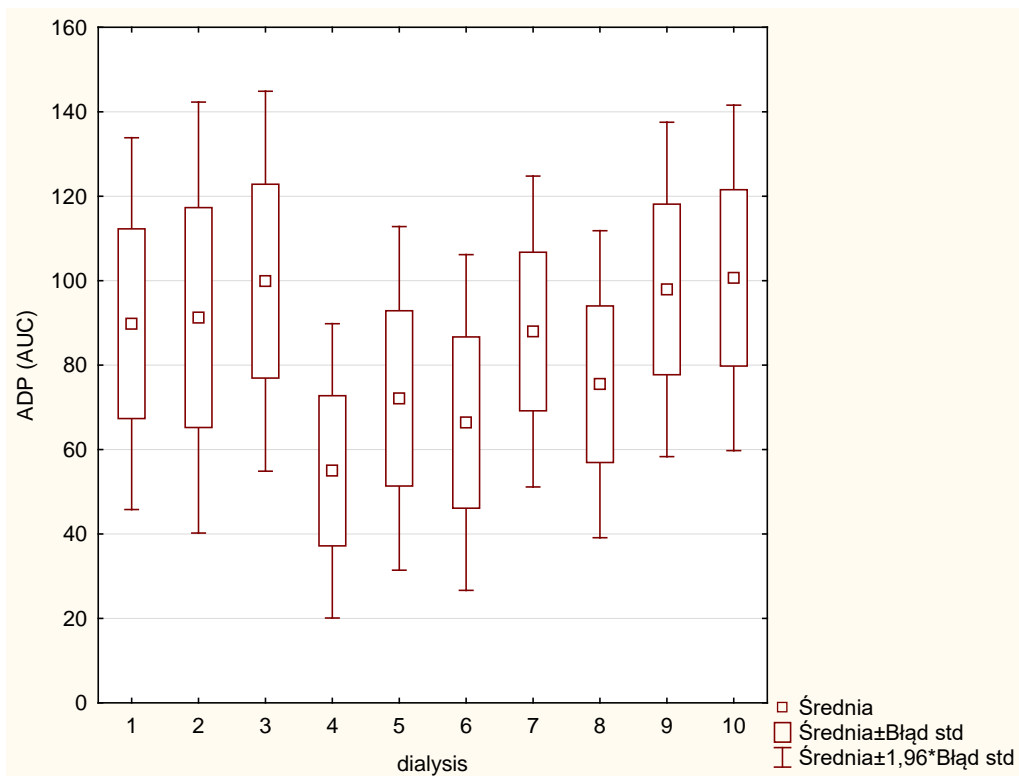
Rys. 4-3. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-czas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **przed dializatorem**



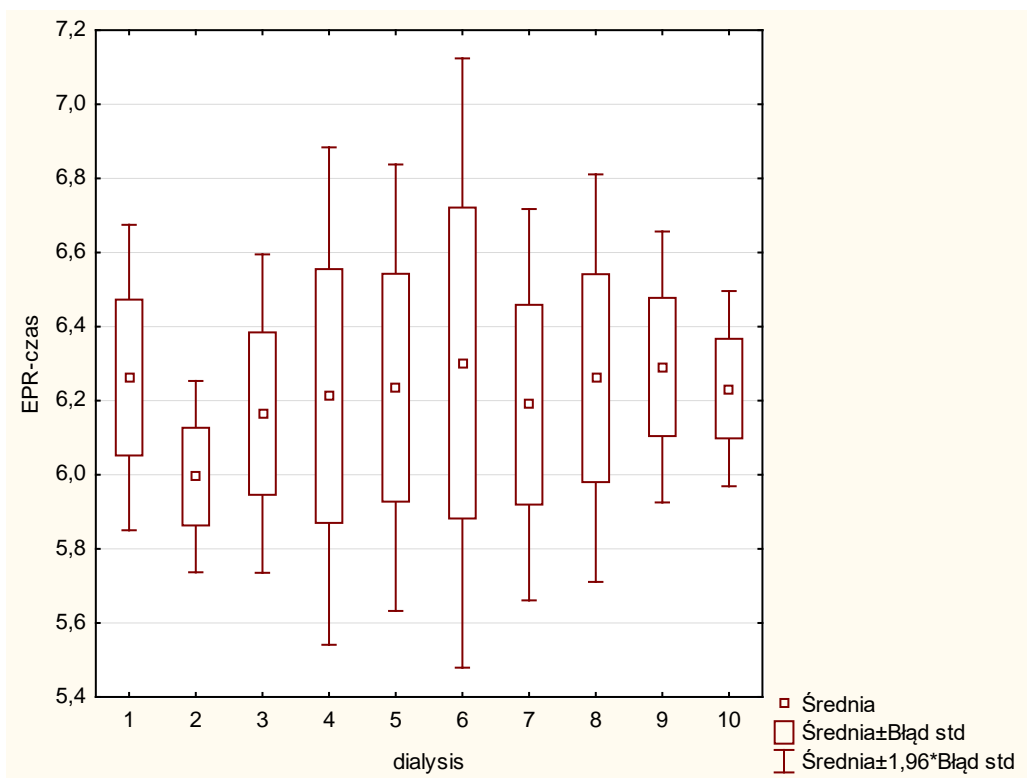
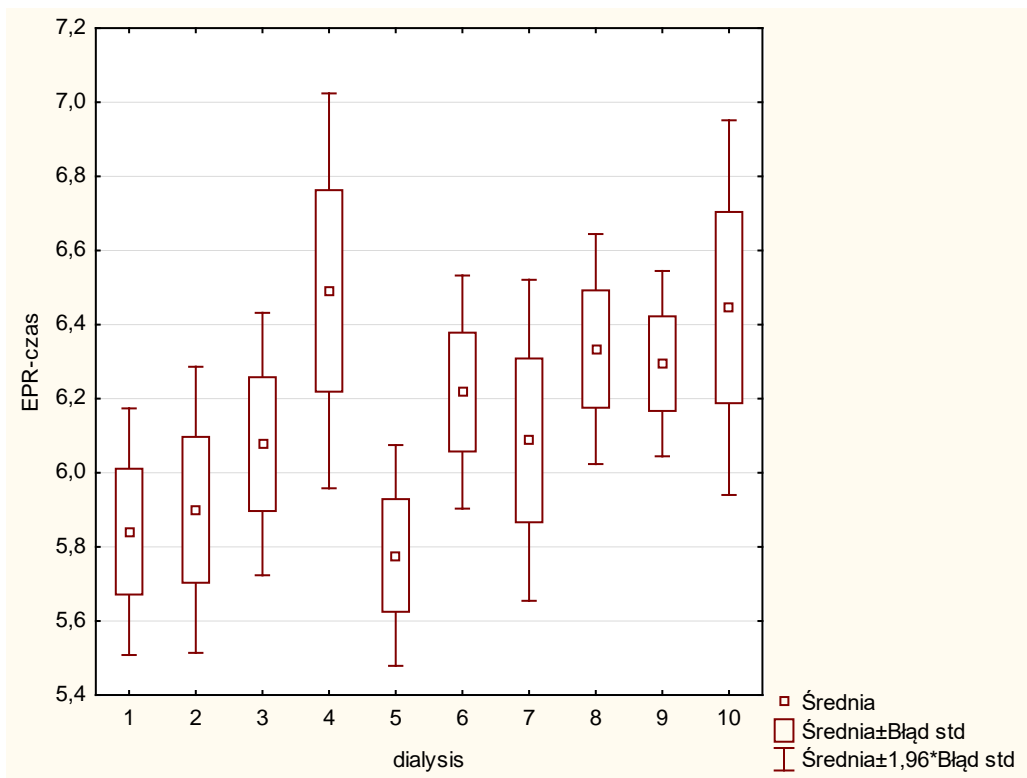
Rys. 4-4. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbkę pobrana **przed dializatorem**



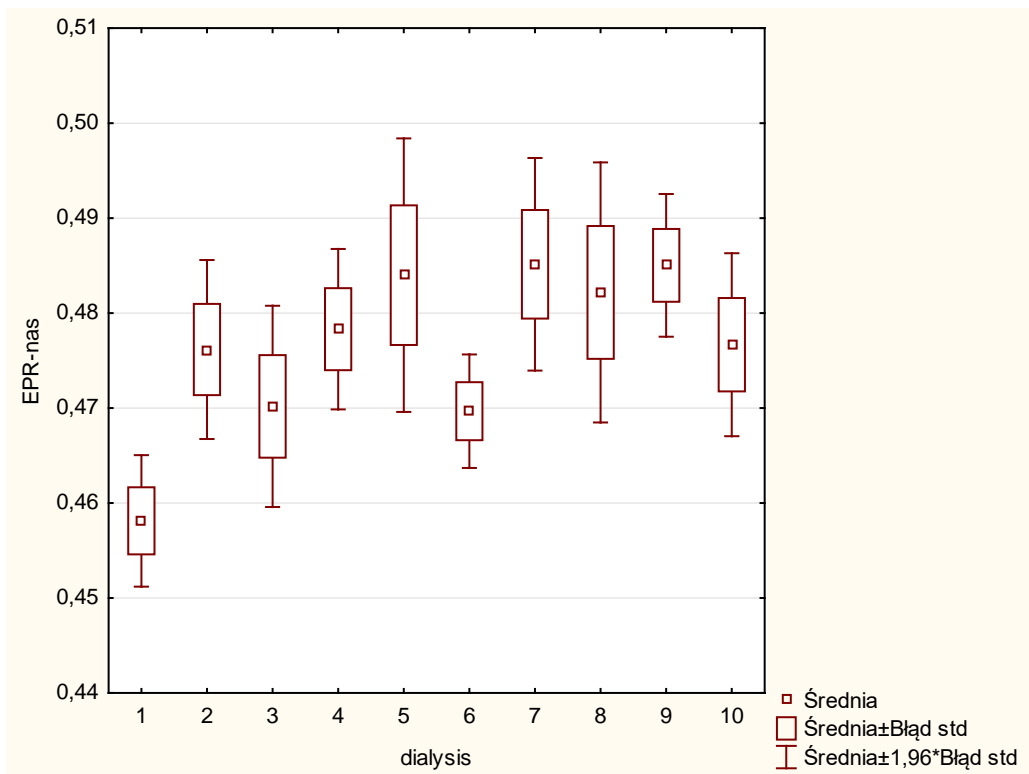
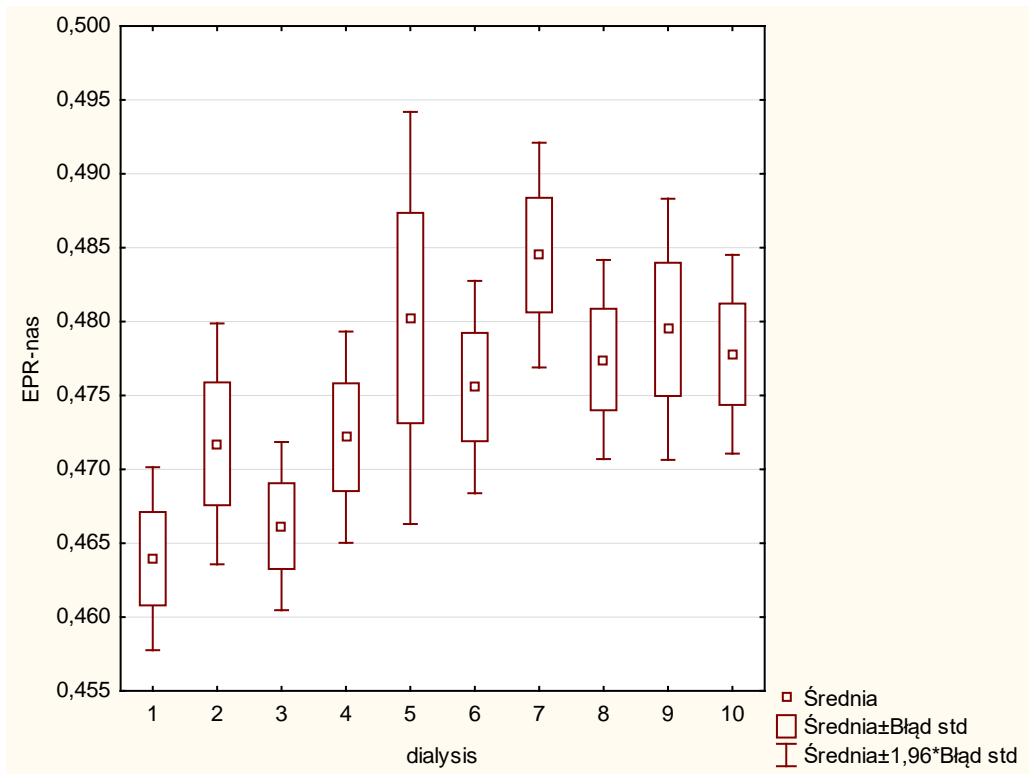
Rys. 4-5. Wykres box-plot dla zmiennej koll (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **za dializatorem**



Rys. 4-6. Wykres box-plot dla zmiennej ADP (AUC) w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **za dializatorem**



Rys. 4-7. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-czas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **za dializatorem**



Rys. 4-8. Wykres box-plot dla zmiennej EPR-nas w odniesieniu do K (wyżej)/NIR (niżej) dla poszczególnych dializ. Próbką pobrana **za dializatorem**