

Wstęp W ostatnich latach rosnąca liczba badań koncentruje się na mikropęcherzykach – fragmentach błony komórkowej, które pełnią funkcję nośników sygnałów uwalnianych przez różne typy komórek. W przypadku erytrocytów struktury te określane są jako pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzenia erytrocytarnego. Podczas gdy większość aktualnych badań skupia się na pęcherzykach wydzielanych przez komórki nowotworowe, stosunkowo niewiele wiadomo o mikropęcherzykach pochodzących z ludzkich erytrocytów. W trakcie przechowywania erytrocytów w warunkach banku krwi dochodzi do zmian strukturalnych, biochemicznych i funkcjonalnych. Zmiany te mogą stanowić markery starzenia się erytrocytów i mikropęcherzyków oraz są powiązane z powikłaniami poprzetoczeniowymi. Obecnie nie istnieje wystandaryzowana metoda oceny biologicznej jakości przechowywanych koncentratów krwinek czerwonych (KKCz) poza konwencjonalnymi wskaźnikami biochemicznymi. Obecność i charakterystyka mikropęcherzyków pochodzenia erytrocytarnego mogą stanowić nowy, klinicznie istotny biomarker jakości KKCz, co nadal pozostaje niezaspokojoną potrzebą w medycynie transfuzjologicznej. **Cel** Celem projektu jest scharakteryzowanie mikropęcherzyków pochodzenia erytrocytarnego jako nowych biomarkerów starzenia się erytrocytów oraz pogorszenia ich jakości w trakcie przechowywania, co w konsekwencji może przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa przetoczeń i optymalizacji protokołów przechowywania krwi. W szczególności planujemy zbadać zmiany jakościowe i ilościowe mikropęcherzyków uwalnianych w trakcie przechowywania koncentratów krwinek czerwonych, w kontekście starzenia się erytrocytów w warunkach banku krwi. Analiza składu, markerów, liczby oraz parametrów morfometrycznych tych mikropęcherzyków może stanowić cenny wskaźnik jakości produktów krwiopochodnych i przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw różnych chorób. Stawiamy hipotezę, że zmiany w liczbie, morfologii i zawartości mikropęcherzyków będą ściśle zależne od czasu przechowywania erytrocytów. **Opis badań** W projekcie mikropęcherzyki pochodzenia erytrocytarnego będą izolowane przy użyciu przeciwciała rozpoznającego glikoforynę A (specyficzny marker erytrocytów) oraz aneksyny V, która wiąże fosfatydyloserynę (sygnał „zjedz mnie” obecny na powierzchni pęcherzyków). Umożliwi to ich identyfikację i analizę przy użyciu cytometrii przepływowej – dynamicznie rozwijającej się technologii uznawanej za „złoty standard” w wykrywaniu mikropęcherzyków. Ponadto, w celu uzyskania bardziej szczegółowego i wielowymiarowego obrazu, zastosowana zostanie cytometria spektralna. Technika ta analizuje pełne spektra emisyjne fluorochromów, co umożliwia jednocześnie oznaczanie wielu markerów z wyjątkową precyzją i rozdzielczością. Ułatwi to stworzenie szczegółowej mapy fenotypowej mikropęcherzyków na różnych etapach przechowywania. Do precyzyjnego oznaczenia liczby i rozmiaru mikropęcherzyków wykorzystane zostaną kulki kalibracyjne o znanym rozmiarze i stężeniu. Trójwymiarowe obrazy mikropęcherzyków oraz rozkład przestrzenny cząsteczek powierzchniowych zostaną uzyskane przy użyciu mikroskopii konfokalnej, natomiast szczegółowe analizy ultrastrukturalne na poziomie nanometrów przeprowadzone zostaną z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Poza analizami morfologicznymi i cytometrycznymi przeprowadzona zostanie analiza transkryptomyczna (RNA-seq), w celu identyfikacji i charakterystyki rodzajów RNA (mRNA, miRNA, lncRNA) obecnych w mikropęcherzykach oraz oceny zmian w ich zawartości w zależności od czasu przechowywania. Projekt obejmuje również analizę proteomiczną opartą na technikach spektrometrii mas, mającą na celu określenie składu białkowego mikropęcherzyków. Pozwoli to na identyfikację białek zaangażowanych w starzenie się erytrocytów i potencjalnych markerów jakości KKCz. Ponadto oceniony zostanie wpływ mikropęcherzyków na układ odpornościowy. Mikropęcherzyki mogą być rozpoznawane i fagocytowane przez monocyty dzięki ekspozycji fosfatydyloseryny i innych sygnałów „zjedz mnie”, co wpływa na aktywację monocytów i wydzielanie cytokin. W związku z tym poziomy cytokin (zarówno pro-, jak i przeciwzapalnych) zostaną oznaczone metodą immunoenzymatyczną ELISA w celu dokładnej oceny właściwości immunomodulujących mikropęcherzyków. **Główne wyniki** Wyniki analiz cytometrycznych, proteomicznych, mikroskopowych i molekularnych umożliwią stworzenie kompleksowego obrazu zmian zachodzących w mikropęcherzykach pochodzenia erytrocytarnego w trakcie przechowywania KKCz. Pozwoli to na lepsze zrozumienie procesów starzenia się erytrocytów oraz interakcji mikropęcherzyków z komórkami układu odpornościowego, w tym mechanizmów fagocytozy przez monocyty. Uzyskane wyniki mogą doprowadzić do opracowania predykcyjnych markerów jakości produktów krwiopochodnych, stworzenia nowych wytycznych dotyczących przechowywania KKCz oraz opracowania strategii ograniczających powikłania immunologiczne związane z transfuzją.