

ADAM ANTOSIK, HALINA MAŁGORZATA ŻBIKOWSKA

*Katedra Biochemii Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
E-mail: zbikow@biol.uni.lodz.pl*

KONCENTRATY KRwinek CZERWONYCH W TRANSFUZJOLOGII

WSTĘP

Krew, jej składniki i produkty krwiopochodne są powszechnie stosowanymi środkami leczniczymi. Obecnie w małym stopniu wykorzystywana jest krew pełna, a leczenie krwią polega na uzupełnieniu brakujących jej elementów (płytki krwi, krwinki czerwone czyli erytrocyty, granulocyty, białka osocza). Koncentraty krwinek czerwonych (KKCz) otrzymuje się przez usunięcie osocza z krwi pełnej, często zastępując go roztworem substancji uzupełniających. Objętość jednostki KKCz waha się między 200–350 ml, a wartość hematokrytu 50–85%. Teoretycznie jedna jednostka KKCz przetoczona osobie dorosłej powinna zwiększyć stężenie hemoglobiny o 1 g/dl (KLEIN i współaut. 2007). W praktyce efekt ten jest uwarunkowany różnymi czynnikami, takimi jak wzrost i masa ciała pacjenta, zawartość hemoglobiny w jednostce koncentratu, wiek komórek, a także stan zdrowia pacjenta. Wykazano m. in. mniejszy wzrost stężenia hemoglobiny u pacjentów ze splenomegalią i niewydolnością nerek. Wskazaniem do przetoczenia krwinek czerwonych jest znaczna niedokrwistość zagrażająca niedotlenieniem ważnych dla życia narządów. Jej przyczyną może być duża utrata krwi, upośledzenie erytropoezy czy wzmożony rozpad erytrocytów (hemoliza). Pacjenci ze stanami chorobowymi, w których istnieje znaczna niedokrwistość, np. w przebiegu zespołów mielodysplastycznych, niedokrwistości aplastycznej, hemoglobinopatii, poddawani są transfuzjom KKCz przez całe życie (BOSMAN i współaut. 2008).

Standardowo KKCz przechowywane są w warunkach chłodniczych przez okres od 21 do 35 dni, w zależności od składu płynu konserwującego. Zastosowanie płynów wzbogacających, zawierających dodatkowe składniki (mannitol, guanozyna), umożliwia wydłużenie czasu przechowywania do 42 dni (HESS 2010a). Podczas przechowywania w krwinkach czerwonych zachodzą postępujące zmiany metaboliczne, biochemiczne, biomechaniczne i funkcjonalne, przejawiające się głównie obniżeniem stężenia ATP i 2,3-bisfosfoglicerynianu (2,3-DPG), wzmożoną peroksydacją lipidów, spadkiem elastyczności błony, zwiększonym wyciekaniem jonów potasu z komórki, wzrostem aktywności pokazomórkowej dehydrogenazy mleczanowej, markera uszkodzenia komórki, i zwiększoną hemolizą. Konsekwencją tych zmian jest skrócenie poprzetoczeniowego czasu przeżycia krwinek w organizmie biorcy. Odzysk w krążeniu biorcy przetoczonych „starszych” KKCz (większość autorów za „starszy wiek” uznaje krwinki przechowywane ponad 14 dni) zachodzi wolniej, czego skutkiem może być konieczność podawania pacjentowi większej liczby jednostek koncentratów tych komórek (AGARWAL i współaut. 2005, HESS 2010b).

W transfuzjologii badania są ukierunkowane na poprawę jakości przechowywanych KKCz poprzez opracowanie skuteczniejszych roztworów wzbogacających. Związki wykazujące właściwości antyoksydacyjne mogą chronić komórki przed szkodliwym działa-

niem reaktywnych form tlenu. Substancje te często wspomagają naturalne mechanizmy ochronne, co umożliwiłoby utrzymanie dłuższej żywotności oraz zachowanie funkcjonalności krwinek czerwonych (HESS 2010b). Ze względu na niekorzystne zmiany zachodzące podczas przechowywania konieczne jest stałe monitorowanie krwinek czerwonych. Obecnie najważniejszymi parametrami charakteryzującymi jakość przechowywanych KKCz są: stężenie glukozy, ATP, 2,3-DPG i potasu oraz stężenie wolnej hemoglobiny (LACHERT 2005). Szansą na polepszenie jakości krwi i jej składników są prowadzone na szeroką skalę badania nad poznaniem proteomu erytrocytu i porównywanie go z proteomem przechowywanych krwinek czer-

wonych. Obecnie badania te skupiają się przede wszystkim na poznaniu zmian, jakie zachodzą w białkach cytoszkieletu i medium (osocze) przechowywanych krwinek oraz na określeniu ilościowego i jakościowego składu mikrocząstek (ANNIS i współaut. 2005, D'AMICI i współaut. 2007, RUBIN i współaut. 2008, HESS 2010a). Poznanie mechanizmów zjawisk zachodzących w krwinkach czerwonych podczas ich starzenia się w warunkach *ex vivo* umożliwi wyjaśnienie przyczyn niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Poprawa obecnej praktyki przechowywania KKCz mogłaby mieć ogromny wpływ na dostępność koncentratów oraz bezpieczeństwo i skuteczność terapii.

PRZECHOWYWANIE I RODZAJE KONCENTRATÓW KRWINEK CZERWONYCH

KKCz przechowuje się w temperaturze 1-6°C maksymalnie do 21, 35 lub 42 dni w zależności od składu płynu w jakim znajdują się komórki. Płyn ten zapobiega krzepnięciu krwi, zawiera też substancje odżywcze, umożliwiające dłuższą żywotność krwinek czerwonych. Płyny konserwujące umożliwiają przechowywanie KKCz do 21 dni i zawierają cytrynian trisodowy, antykoagulant chelatujący jony wapnia niezbędne w kaskadzie krzepnięcia krwi, a także glukozę, która jest składnikiem odżywczym, wspomagającym utrzymanie stałego wytwarzania ATP na drodze glikolitycznej. Do płynów konserwujących należą ACD (kwas cytrynowy-cytrynian-glukoza) oraz CPD i CP2D (cytrynian-glukoza-fosforan). Kwas cytrynowy nadaje płynom konserwującym odczyn kwaśny o pH w granicach 5,5-5,8, a dodatek fosforanu zapobiega wypływowi fosforanu z krwinki czerwonej poprzez zmniejszenie gradientu jego stężenia komórkowego i pozakomórkowego. Fosforan służy jako bufor przeciwdziałając spadkowi pH, jest też substratem dla syntezy 2,3-DPG. Płyn konserwujący CPDA jest dodatkowo wzbogacony w adeninę, zasadę azotową, która zapobiega zmniejszeniu stężenia ATP i umożliwia przechowywanie KKCz do 35 dni.

Roztwory wzbogacające (uzupełniające) podtrzymują żywotność krwinek czerwonych w koncentratkach otrzymanych po usunięciu osocza. Zwykle zawierają w swoim składzie chlorek sodu zapewniający izoosmotyczność roztworu (HESS 2006, SPARROW 2012). Pierwszym płynem wzbogacającym opracowanym

pod koniec lat 70. XX w. był SAG (chlorek sodu-adenina-glukoza). W 1981 r. uzyskano SAGM, zawierający dodatkowo mannitol, który jest polihydroksylowym alkoholem cukrowym stabilizującym błony komórkowe (zmniejsza hemolizę), a także związkami przeciwutleniającymi. SAGM jest roztworem najpowszechniej stosowanym, jednak nie jest zatwierdzony w USA. Pozostałe płyny wzbogacające różnią się stężeniem niektórych składników i/lub obecnością dodatkowego składnika (Tabela 1). Stosowanie płynów wzbogacających przedłużyło żywotność krwinek czerwonych oraz czas ich przechowywania do 42 dni. Jednak w dalszym ciągu poszukiwane są ulepszone metody wydłużające czas przechowywania krwinek, aby można było w sposób ciągły zabezpieczać w krew chorych. Badania wykazały, że krwinki czerwone zawieszane w roztworze PAGGSM, w skład którego wchodzi dodatkowo fosforany i nukleozyd guanozyna, przechowywane w warunkach chłodniczych do 49 dni, nadal spełniają kryteria jakościowe (VEALE i współaut. 2011). Z trzech porównywanych w tych badaniach płynów wzbogacających (SAGM, PAGGSM i Erythrosol-4 - doświadczalny, hipotoniczny roztwór, nie zawierający chlorku sodu, ani guanozyny o pH=8,8), SAGGSM zapewniał najlepsze warunki przechowywania.

Składniki roztworów wzbogacających, służące utrzymaniu żywotności krwinek czerwonych podczas długotrwałego przechowywania w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa, są bezpieczne dla biorców, nawet dla noworodków, choć brak jest dostatecznych

Tabela 1. Płyny wzbogacające stosowane do przechowywania KKCz (Sparrow 2012).

Składniki	Płyn wzbogacający (uzupełniający)					
	SAGM	AS-1 Adsol	AS-3 Nutricel	AS-5 Optisol	MAP	PAGGSM
NaCl	+	+	+	+	+	+
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	-	-	+
NaH ₂ PO ₄	-	-	+	-	+	+
Kwas cytrynowy	-	-	+	-	+	-
Cytrynian	-	-	+	-	+	-
Adenina	+	+	+	+	+	+
Guanozyna	-	-	-	-	-	+
Glukoza	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+	+	+
Antykoagulant	CPD Europa	CPD	CP2D	CPD	ACD	CPD
Dopuszczone do użytku	Australia Kanada Nowa Zelandia	USA	USA Kanada	USA	Japonia	Niemcy

danych co do ich bezpieczeństwa u wcześniaków w stanie krytycznym wymagających masywnych toczeń (KLEIN i współaut. 2007). Prawidłowe przechowywanie krwinek czerwonych znacznie zwiększa ich dostępność i obniża koszty leczenia, zapewnia również bezpieczeństwo.

Stosowanie różnych rodzajów koncentratów krwinek czerwonych, w zależności od wskazań dla określonych grup pacjentów, zwiększa skuteczność ich działania lub zapobiega niepożądanym reakcjom po ich przetoczeniu. Krwinki czerwone mogą podlegać dalszym zabiegom preparatywnym, takim jak filtracja, napromienianie, przemywanie czy zamrażanie (KLEIN i współaut. 2007, LIUMBRUNO i współaut. 2008). W KKCz znajduje się niewielki odsetek leukocytów i płytek krwi, które mogą ulegać degradacji podczas przechowywania. Powoduje to uwalnianie cytokin oraz enzymów, takich jak glikozydazy, lipazy i proteazy, czego efektem jest dealkilacja lipidów, fragmentacja białek oraz usuwanie cukrów pełniących funkcje ochronne. Zmniejszenie liczby białych krwinek i płytek krwi w KKCz poprzez filtrację (leukoredukcja) zapobiega uszkodzeniom erytrocytów, m.in. zmniejsza hemolizę i możliwość

tworzenia mikroagregatów zwiększając ich odzysk po transfuzji (HOGMAN i MERYMAN 1999). Przetoczenie ubogoleukocytarnego KKCz zmniejsza ryzyko aloimmunizacji antygenami HLA oraz poprzetoczeniowego zakażenia wirusem cytomegalii (ŁĘTOWSKA i ROSIEK 2006).

KKCz przeznaczone do transfuzji pacjentom ze szczególnym ryzykiem wystąpienia poprzetoczeniowej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. transfusion associated graft versus host disease, TA-GvHD) są napromieniane w celu usunięcia aloreaktywnych limfocytów T pochodzących od dawcy (MOROFF i LUBAN 1997). TA-GvHD, chociaż zdarza się bardzo rzadko, stanowi poważny problem w praktyce klinicznej ze względu na brak skutecznego leczenia i wysoką śmiertelność (80–90%). Szczególnie narażeni na TA-GvHD są pacjenci z niewydolnością układu immunologicznego, z dziedzicznymi i nabytymi schorzeniami systemu odpornościowego, m. in. chorobą Hodgkin'a, która jest złośliwym nowotworem układu chłonnego, a także pacjenci ze stłumioną aktywnością układu odpornościowego po chemioterapii i radioterapii lub po przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych oraz noworodki i

niemowlęta. Napromieniowaną krew stosuje się także w transfuzjach dopłodowych. Również w grupie ryzyka są biorcy spokrewnieni z dawcą. W tym przypadku dochodzi do nie rozpoznania przez biorcę przetoczonego składnika krwi jako obcego, co wynika z podobieństwa układu HLA na przetoczonych limfocytach T dawcy z układem HLA na komórkach biorcy. Powoduje to niezakłóconą proliferację limfocytów dawcy w organizmie biorcy. Podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku transfuzji składnika krwi, gdy biorca i dawca pochodzą z populacji wysoce jednorodnych (Japonia, Izrael) (PELESZYNSKI i współaut. 1994). Napromienianie krwi jest obecnie jedynym skutecznym sposobem zabezpieczającym chorych leczonych krwią lub jej składnikami przed TA-GvHD. Zastosowanie promieniowania jonizującego (γ lub X) jest możliwe ze względu na duże różnice we wrażliwości komórek krwi na jego działanie. Limfocyty, komórki jądrzaste, są strukturami najbardziej wrażliwymi na działanie promieniowania jonizującego. Możliwe jest dobranie dawki promieniowania, która hamuje aktywność proliferacyjną limfocytów jednocześnie zachowując właściwości funkcjonalne komórek stosowanych w celach terapeutycznych, jak płytki krwi i krwinki czerwone (MOROFF i LUBAN 1997). Krew, jak i jej komórkowe komponenty napromieniowuje się w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa z użyciem źródła promieniowania γ jakim jest cez (^{137}Cs) lub kobalt (^{60}Co). Podczas napromieniania każda część składnika otrzymuje dawkę promieniowania nie mniejszą niż 25 Gy i nie większą niż 50 Gy. Czas ekspozycji musi być zwalidowany dla każdego źródła promieniowania i poddawany systematycznej ponownej kontroli z uwzględnieniem czasu rozpadu izotopu. Krwinki czerwone mogą być napromieniowane w ciągu 14 dni od daty pobrania i po napromienieniu przechowywane do 28 dni od daty pobrania. W przyszłości niektóre metody inaktywacji czynników chorobotwórczych mogą zastąpić napromienianie składników krwi. W chwili obecnej

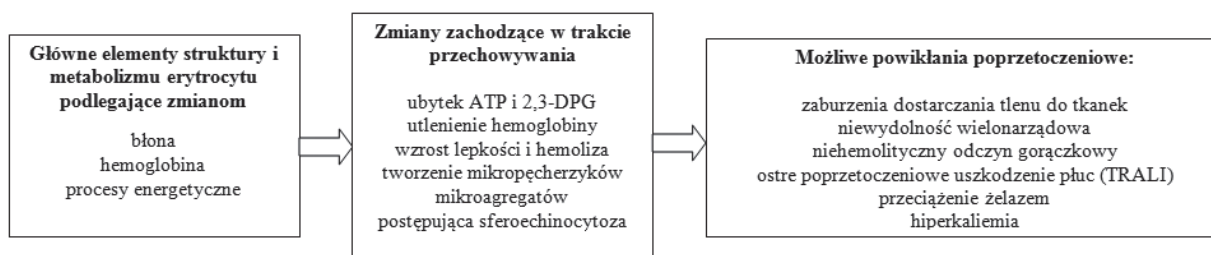
metody inaktywacji znajdują zastosowanie jedynie w odniesieniu do koncentratów krwinek płytkowych i świeżo mrożonego osocza, ale trwają badania nad opracowaniem odpowiedniej metody umożliwiającej inaktywację patogenów także w krwinkach czerwonych (LACHERT i ANTONIEWICZ-PAPIS 2010).

Zastosowanie kriokonserwacji miało znaczący wpływ na wydłużenie czasu przechowywania krwinek czerwonych. Mrożony KKCz stanowią krwinki, do których dodaje się odpowiedni roztwór kriochronny i przechowuje w temperaturze od -60 do -80°C lub niższej (-150°C) w zależności od stosowanej metody. Daje to możliwość przechowywania KKCz nawet przez 10 lat. Związki wykorzystywane w kriokonserwacji, których zadaniem jest niedopuszczenie do tworzenia kryształów lodu w komórce, dzieli się na dwie grupy (i) w zależności od mechanizmu działania oraz (ii) zdolności do przemieszczania się przez błony komórkowe. Do związków nieprzenikających do wnętrza komórek zaliczane są na przykład alkohole cukrowe i pochodne skrobi. Związki te zazwyczaj stosowane są w stężeniach mikromolowych i działają poprzez odwodnienie komórek. Glicerol i dimetylosulfotlenek są przykładami związków, które wnikając do komórek zapobiegają nagłej zmianie objętości płynów i chronią komórki przed uszkodzeniem podczas powolnego schładzania (SCOTT i współaut. 2005). Mrożenie KKCz w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa odbywa się z zastosowaniem glicerolu i metoda różni się w różnych ośrodkach. Stosowane są różne stężenia glicerolu (zwykle 40% i 20%) i temperatury przechowywania koncentratów. Niestety konieczność rozmrażania i płukania może opóźnić przetoczenie KKCz, co może mieć istotne znaczenie przy transfuzji w sytuacjach nagłych. Opracowywane są płyny, które umożliwią przechowywanie rozmrożonych krwinek czerwonych do 14 dni. Trwają także badania nad hydroksyetylowaną skrobią, jako alternatywnym związkiem kriochronnym (SCOTT i współaut. 2005).

STARZENIE SIĘ KRwinek CZERWONYCH W WARUNKACH *EX VIVO*

Krwinki czerwone standardowo przechowywane w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa starzeją się szybciej niż w organizmie; średni czas życia erytrocytu w organizmie wynosi około 120 dni. Kryterium jakościowym określającym żywotność przechowywanych krwinek czerwonych

jest przeżycie 75% przetoczonych, znakowanych radioizotopem, komórek w ciągu 24 godzin, co oznacza, że $\frac{1}{4}$ komórek z podanej jednostki krwinek czerwonych może nie funkcjonować w organizmie biorcy (KLEIN i współaut. 2007). Przechowywane krwinki czerwone ulegają zmianom metabolicznym,



Ryc. 1. Najważniejsze zmiany zachodzące w krwinkach czerwonych podczas przechowywania i reakcje poprzetoczeniowe (wg SCOTT i współaut. 2005, ŁĘTOWSKA i ŻUPAŃSKA 2009).

biochemicznym i molekularnym (Ryc. 1). W krwinkach czerwonych dochodzi do wyczerpania układów enzymatycznych oraz wielu związków chemicznych biorących udział w prawidłowym przebiegu wewnątrzkomórkowych procesów przemiany materii. Zachwiana zostaje równowaga pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym z powodu nagromadzenia się wielu produktów ubocznych przemian metabolicznych. W KKCz przechowywanych ponad dwa tygodnie może dojść do zwiększonej hemolizy krwinek i wzrostu stężenia jonów potasu w płynie pozakomórkowym, zmniejszenia ich żywotności i aktywności biologicznej (HESS 2010a, b; SCOTT i współaut. 2005, STOWELL 2010). W napromienionych KKCz powyższe zmiany zachodzą szybciej, co skraca czas ich przechowywania z 42 do 28 dni. Ze względu na brak jądra w erytrocytach, uważa się, że promieniowanie oddziałuje przede wszystkim na błonę erytrocytu.

Do najważniejszych parametrów charakteryzujących jakość krwinek czerwonych należą: stężenie ATP i 2,3-DPG wewnątrz komórki oraz stężenie jonów potasu i wolnej

hemoglobiny w płynie pozakomórkowym (Tabela 2).

Erytrocyty potrzebują energii zgmagazynowanej w formie ATP do utrzymania kształtu, fosforylacji białek i fosfolipidów, syntezy glutationu i częściowej syntezy nukleotydów pirymidynowych i purynowych oraz aktywnego transportu cząsteczek przez błonę. W erytrocytach energia wytwarzana jest w procesie glikolizy, a glukoza jest głównym substratem dostarczającym ATP. W procesie glikolizy glukoza metabolizowana jest do mleczanu i jonów wodorowych. Wzrost stężenia jonów wodorowych w przechowywanych KKCz skutkuje obniżeniem pH i zwolnieniem przebiegu glikolizy na skutek hamowania heksokinazy i fosfofruktokinazy, dwóch enzymów początkowego szlaku glikolizy (HESS 2010b). Podczas przechowywania, w krwinkach czerwonych stężenie ATP maleje z upływem czasu, prowadząc do zmian w kształcie oraz do utraty lipidów błon i zmniejszenia odkształcalności komórek. Po przetoczeniu krwinki o niskiej zawartości ATP są szybciej usuwane z krążenia (HOGMAN i MERYMAN 1999, ALMAC i INCE 2007).

Tabela 2. Zmiany biochemiczne zachodzące w KKCz przechowywanych w roztworze wzbogacającym ADSOL (LACHERT 2005).

Oznaczone parametry	Dzień 1	Dzień 42
ATP (mM/gHb)	3,5 ± 0,4	2,1 ± 0,3
2,3-DPG (mM/gHb)	14,1 ± 2,3	1,2 ± 0,2
Potas (mmol/l)	5,0 ± 0,31	15,0 ± 1,15
Sód (mmol/l)	147,9 ± 2,5	136,3 ± 5,5
Hb supernatant (mg/dl)	36,1 ± 22,8	428,6 ± 194,0
Glukoza (mg/dl)	1023 ± 52,8	600,5 ± 51,1
pH	7,1 ± 0,3	6,4 ± 0,2

Wytwarzanie przez erytrocyty znacznej ilości 2,3-bisfosfoglicerynianu na szlaku Rapoport-Lueberinga, pobocznym szlaku glikolizy, stanowi ważny czynnik regulujący zdolność hemoglobiny do przenoszenia tlenu. Podczas metabolizmu glukozy w KKCz obniża się pH osocza i zmniejsza się stężenie 2,3-DPG (HESS 2010b). Rola 2,3-DPG w funkcjonowaniu erytrocytów jest dobrze poznana. Związek ten zmniejsza powinowactwo hemoglobiny do tlenu, a tym samym ułatwia jego odłączenie w tkankach. Z tego powodu zmiany stężenia 2,3-DPG są ważnym wskaźnikiem utraty zdolności przenoszenia tlenu przez erytrocyty. Stężenie 2,3-DPG znacznie się zmniejsza w drugim tygodniu przechowywania KKCz. W KKCz z wyczerpanymi zapasami 2,3-DPG powinowactwo hemoglobiny do tlenu znacząco wzrasta, skutkiem czego maleje jej zdolność dostarczania tlenu do tkanek. Obserwacje te wzbudzają obawy, że przechowywane ponad 14 dni KKCz mogą nie dostarczać wystarczającej ilości tlenu pacjentom z ostrą niedokrwistością związaną na przykład z masywnym krwawieniem. W takim przypadku wskazane byłoby podawanie krwinek przed 14 dniem przechowywania. Zmniejszenie stężenia 2,3-DPG w przechowywanych KKCz nie ma jednak znaczących konsekwencji klinicznych, gdyż związek ten jest syntetyzowany w krążeniu biorcy. Powrót do normy zwykle następuje w ciągu doby po transfuzji, ale po całkowitym spadku stężenia 2,3-DPG w koncentratkach dłużej przechowywanych (znacznie powyżej 14 dni) proces ten może trwać 2 do 3 dni (HOGMAN i MERYMAN 1999).

Potas gromadzony jest w krwince czerwonej w wyniku transportu aktywnego, a jego stężenie wewnątrz komórki jest ponad 20-krotnie wyższe niż w środowisku zewnętrznym. Za utrzymanie równowagi osmotycznej i jonowej komórki odpowiedzialna jest błona komórkowa. Podczas przechowywania straty energetyczne powodują osłabienie transportu czynnego przy udziale Na^+/K^+ -ATPazy i wyciek jonów K^+ na zewnątrz komórki (ALMAC i INCE 2007). Pompa K^+/Na^+ w niskiej temperaturze przechowywania ma bardzo małą aktywność i niedostatecznie przeciwdziała dyfuzji jonów. Podniesienie temperatury KKCz do 37°C przed transfuzją reaktywuje pompę, cofając zaburzenie równowagi K^+/Na^+ dopóki jest wystarczająca ilość ATP do napędzania pompy K^+/Na^+ . Napromienianie uszkadza błonę komórkową krwinek czerwonych, zwiększając jej prze-

puszczalność, co zwiększa wyciek jonów potasu. Przetoczenie napromienionych erytrocytów z dużym stężeniem pozakomórkowego potasu może u biorcy wywołać hiperkaliemię. W wyniku uszkodzenia błony erytrocytu dochodzi również do zwiększenia zawartości pozakomórkowej hemoglobiny. Oporność osmotyczna erytrocytów zależy od ich wieku i sprawności czynnościowej błony komórkowej (HESS 2010a, b; STOWELL 2010).

Podczas przechowywania krwinek czerwonych zmienia ulega ich kształt. Z prawidłowej formy, jaką jest dwuwklęsły dysk z widocznym przejaśnieniem w środku, przez pośrednie formy kuliste z pojawiającymi się wypustkami, krwinki przyjmują kształt sferocytów. Zmiana kształtu krwinek czerwonych podczas ich przechowywania powoduje zmiany reologiczne, zwiększenie lepkości krwi i wolniejszy przepływ przez naczynia włosowate. Większość opisanych zmian może być odwracalna po zawieszeniu krwinek w mieszaninie substancji odżywczych w neutralnym pH, czemu towarzyszy wzrost stężenia ATP i 2,3-DPG. W odpowiednich warunkach można przywrócić prawidłowy kształt i funkcję krwinek czerwonych. Zabieg ten określany jest w transfuzjologii jako odmładzanie krwinek czerwonych (ang. rejuvenation) (ALMAC i INCE 2007). W skład płynów odmładzających (ang. rejuvenation solutions), np. Rejuvesolu, wchodzi pirogronian sodu, inozyna, adenina oraz jedno- i dwuzasadowy fosforan, pH płynów waha się od 6,7 do 7,4 (MEYER i współaut. 2011). Płyny takie mogą być dodawane do przechowywanych krwinek czerwonych 3 dni przed końcem ich przydatności. Składnik krwi jest zwykle inkubowany z płynem odmładzającym przez godzinę w celu pobrania niezbędnych składników, przed dokonaniem transfuzji wskazane jest przemycie KKCz. Usunięcie płynu odmładzającego jest konieczne, ponieważ inozyna może być przekształcona do toksycznego produktu (kwas moczowy). Odmłodzony w taki sposób KKCz musi być w ciągu 24 godzin przetoczony (przechowywanie w temperaturze $1-6^\circ\text{C}$) lub poddany kriokonserwacji (RUDMANN 2005). Procedura ta nie jest powszechnie stosowana ze względu na cenę i krótki czas przydatności składnika krwi.

Niektóre zmiany zachodzące podczas przechowywania krwinek czerwonych nie są jednak odwracalne. Nieodwracalnym procesem jest zmniejszenie powierzchni komórki, które jest następstwem uwalniania mikrocząstek (mikropęcherzyków) z błony komórko-

wej. W przechowywanych KKCz tworzą się różne populacje mikrocząstek różniące się wielkością i składem. Mikrocząstki zawierają hemoglobinę, niektóre zawierają utlenione lipidy, większość charakteryzuje się ekspozycją fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni. Mikropęcherzyki nie zawierają białek szkieletu błonowego (HESS 2010b).

Przechowywane krwinki czerwone narażone są na działanie reaktywnych form tlenu. W trakcie przechowywania zmniejsza się też stężenie glutationu i aktywność enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej. Głównym źródłem anionorodnika ponadtlenkowego w krwinkach czerwo-

nych jest autoutlenianie hemoglobiny, czyli spontaniczne przejście oksyhemoglobiny w methemoglobinę. W krwiobiegu powstająca methemoglobina jest redukowana przez reduktazę methemoglobinową, zaś uwalniany anionorodnik ponadtlenkowy reaguje ze składnikami erytrocytu lub ulega reakcji dysmutacji z utworzeniem tlenu i nadtlenku wodoru. W przechowywanych krwinkach z czasem dochodzi do hamowania szlaków glikolitycznych oraz zmniejszenia stężenia glutationu. W takich warunkach w obecności jonów żelaza lub hemu dochodzi do wytworzenia rodnika hydroksylogowego w reakcji Fentona, który może uszkadzać białka i lipidy.

WIEK KRWINEK CZERWONYCH A RYZYKO NIEPOŻĄDANYCH REAKCJI POPRZETOCZENIOWYCH

Przetoczenie krwi lub jej składników zawsze obarczone jest ryzykiem wystąpienia reakcji poprzetoczeniowych. Powikłania te stanowią zróżnicowaną grupę niekorzystnych reakcji na transfuzję i mogą być w różny sposób klasyfikowane. Najczęstszym kryterium podziału jest czas, w jakim pojawiają się objawy (wczesne, późne), mechanizm powstawania (immunologiczne i nieimmunologiczne) oraz hemoliza (hemolityczne i niehemolityczne) (ŁĘTOWSKA i ŻUPAŃSKA 2009). Do wczesnych powikłań immunologicznych należy zaliczyć ostry odczyn hemolityczny (hemoliza po przetoczeniu obcogrupowej krwi), niehemolityczny odczyn gorączkowy, który jest jedną z najczęstszych reakcji poprzetoczeniowych, ostre poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (TRALI), a także odczyn alergiczny i anafilaktyczny (związane z obecnością białek osocza w przetoczonym składniku krwi). Późne powikłania immunologiczne to przede wszystkim aloimmunizacja (wytworzenie przeciwciał przeciwko obcym antygenom obecnym w przetoczonym składniku), poprzetoczeniowa skaza małopłytkowa (wytworzenie aloprzeciwciał specyficznych dla krwinek płytkowych), opóźniony odczyn hemolityczny i poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciw biorcy (TA-GvHD). Do powikłań nieimmunologicznych wczesnych zalicza się: posocznicę poprzetoczeniową, przeciążenie układu krążenia (TACO), hipotensję związaną ze stosowaniem inhibitorów ACE, ból w czasie przetoczenia, zator powietrzny, hemolizę nieimmunologiczną, hipotermię, hiperkalcemię i hipokalcemię. Wśród powikłań

późnych nieimmunologicznych wymienia się przeciążenie żelazem i przeniesienie czynników zakaźnych. Poprzetoczeniowe przeciążenie żelazem jest jednym z powikłań występujących u wielokrotnych biorców krwinek czerwonych, zwykle po przetoczeniu ponad 20 j. KKCz (niektórzy autorzy podają 100 j. KKCz), prowadzącym do uszkodzenia narządów wewnętrznych (serce, płuca, nerki) z powodu odkładania się tego pierwiastka.

Wiele danych wskazuje, że zmiany zachodzące podczas przechowywania KKCz (ang. storage lesions) mogą przyczyniać się do występowania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych (Ryc. 1) (OFFNER 2004, HAJJAR i współaut. 2007, KOCH i współaut. 2008, SPINELLA i współaut. 2009, KOR i GAJIC 2010, GMERK i FABIJANSKA-MITEK 2011, PAVENSKI i współaut. 2012). Podczas przechowywania w krwinkach czerwonych mogą namnażać się bakterie. Do zanieczyszczenia KKCz bakteriami może dochodzić podczas pobierania krwi. W celu zapobiegania takim zakażeniom rutynowo miejsce wkłucia dezynfekuje się stosując przynajmniej dwa środki dezynfekcyjne o szerokim zakresie działania (metoda dwustopniowa). Do odkażania skóry najczęściej stosuje się preparaty zawierające alkohol izopropylowy oraz chlorheksydynę. Większość bakterii pochodzących ze skóry dawcy lub przenoszonych poprzez krew ginie w warunkach przechowywania. Zdarzają się jednak drobnoustroje odporne na niską temperaturę, takie jak bakterie z rodzaju *Yersinia* (przede wszystkim *Y. enterocolitica*), *Aeromonas*, *Vibrio*, czy *Serratia*, które bar-

dzo wolno się namnażają, dlatego dopiero po około 20 dniach liczba drobnoustrojów w KKCz osiąga wartość około 10^8 CFU/ml, stanowiącą ryzyko wystąpienia posocznicy przetoczeniowej (HESS 2010b).

Reakcją występującą po przetoczeniu przechowywanych KKCz może być również TRALI. W zespole TRALI wykrywa się przeciwciała leukocytarne, głównie w przetoczonych krwi od dawcy, ale czasem także u chorego. Najczęściej są to przeciwciała anti-HLA lub przeciwgranulocytarne – anti-HNA. Jedną z przyczyn tego powikłania jest także przetaczanie krwinek czerwonych, w których doszło do oksydacyjnych uszkodzeń białek i lipidów bioaktywnych (BUX i SACHS 2007). Związki te mogą prowadzić do ostrej niewydolności płuc poprzez aktywację neutrofilów przyczyniających się do występowania obrzęku tego narządu. Obecność utlenionych białek i lipidów w KKCz może także zwiększać ryzyko zakrzepów (BUX i SACHS 2007, HESS 2010b, STOWELL 2010, TSAI i współaut. 2010). Powikłaniem związanym zarówno z masowymi przetoczeniami, jak i czasem przechowywania KKCz jest hiperkaliemia, spowodowana uwalnianiem potasu na zewnątrz krwinek, której konsekwencją mogą być zaburzenia rytmu serca (zwolnienie czynności serca, pojawienie się skurczów dodatkowych), a nawet całkowite zatrzymanie czynności serca. W przechowywanej krwi pełnej stężenie potasu w osoczu wzrasta o ok. 1 mEq/l/dobę (ZAREMBA i współaut. 2006, RYBAKOWSKI i współaut. 2012).

Wraz z czasem przechowywania dochodzi do zmiany kształtu krwinek czerwonych i wytwarzania mikropęcherzyków (mikrocząstek). Wpływ powstających mikrocząstek na organizm biorcy nie jest do końca wyjaśniony. Ze względu na obecność ujemnie naładowanych lipidów na powierzchni, mogą one u biorcy wykazywać działanie prozapalne i prozakrzepowe (HESS 2010b).

Immunomodulacja zależna od transfuzji (TRIM) jest zjawiskiem biologicznym o bardzo złożonym i nie całkowicie poznanym podłożu (ŁĘTOWSKA i ŻUPAŃSKA 2009). W wyniku przetoczenia krwi lub jej składników organizm biorcy narażony jest na szereg obcych dla niego antygenów znajdujących się na przetoczonych komórkach krwi oraz na antygeny rozpuszczone w przetoczonym osoczu. Z przetoczonymi składnikami dostają się do organizmu biorcy leukocyty dawcy będące podstawowymi komórkami odpowiedzi immunologicznej, a także liczne substancje immunologicznie czynne, w tym antygeny HLA, główne mediatory odpowiedzi immunologicznej. Uważa się, że podstawową rolę w aloimmunizacji i immunomodulacji odgrywają antygeny HLA – brak zgodności antygenów HLA klasy II między dawcą a biorcą. Konsekwencją tego zjawiska może być np. zwiększenie podatności pacjenta na zakażenia czy zwiększenie nawrotów chorób nowotworowych. Usunięcie leukocytów i osocza z KKCz prowadzi do zmniejszenia liczby potencjalnych czynników powodujących TRIM (BROJER 2008). Rygorystyczne wymogi kontroli jakości składników krwi, do których należy określić ich przydatności do użytku klinicznego, zapewniają bezpieczeństwo. Jednak w ostatnim dziesięcioleciu na łamach literatury transfuzjologicznej toczy się dyskusja na temat niekorzystnego wpływu na organizm pacjenta przetaczanych „starszych” krwinek. Dane kliniczne są jednak bardzo skąpe i nie ma obecnie żadnych dowodów wskazujących, że przetaczanie KKCz przechowywanych ponad 14 dni jest obarczone większym ryzykiem niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych (RADZIWIŃ 2009, TRIULZI i YAZER 2010). W interpretacji badań, które wskazują, że „starszy wiek” krwinek może nasilić niektóre reakcje niepożądane po transfuzji należy zachować ostrożność, gdyż z całą pewnością duży wpływ na wyniki końcowe ma metodologia badań i metaanaliz.

BADANIA PROTEOMICZNE KRWINEK CZERWONYCH

Proteomika krwi i jej składników stanowi duże wyzwanie analityczne. Związane jest to z bogatym spektrum białek komórek krwi i osocza, które są zaangażowane w różnorodne procesy, m.in. krzepnięcie krwi, transport, procesy immunologiczne czy sygnalizację komórkową, a także z obecnością ubocznych produktów uszkodzenia komórek i białek pochodzących z innych tkanek. Pro-

teomika posługuje się takimi metodami jak: jedno- i dwuwymiarowa elektroforeza, chromatografia, spektrometria mas (LIUMBRUNO i współaut. 2010). Prowadzone na przestrzeni kilku lat badania ujawniły złożoność proteomu erythrocytu. Pierwszą proteomiczną analizę białek błonowych erythrocytu, z wykorzystaniem elektroforezy jedno- i dwuwymiarowej, przeprowadził Low i współaut. (2002),

wykrywając obecność 102 białek (w tym 59 różnych polipeptydów i 43 izoformy). Następnie KAKHNIASHVILI i współaut. (2004) zidentyfikowali 181 białek erythrocytu, spośród których 91 należało do białek błonowych i 90 do cytosolowych. Autorzy wykorzystali tandemową spektrometrię mas połączoną z chromatografią cieczową. Do 2006 r. liczba zidentyfikowanych białek błonowych erythrocytu wzrosła do 340, a rozpuszczalnych do 252 (PASINI i współaut. 2006). Dwa lata później ROUX-DALVAI i współaut. (2008) stwierdzili występowanie aż 1578 białek we frakcji cytosolowej erythrocytu. Początkowo badania skupiały się głównie na katalogowaniu białek występujących w erythrocytach, tylko nieliczne poszukiwały odpowiedzi na pytanie, jaką funkcję biologiczną białka te pełnią w komórce (GOODMAN i współaut. 2007). Uzupełnieniem badań nad poznaniem funkcji poszczególnych białek są badania porównawcze proteomu erythrocytów pochodzących od zdrowych dawców i od pacjentów z niedokrwistością sierpowatokrwinkową (GHATPANDE i współaut. 2008).

W ostatnich latach proteomika przyczyniła się do poszerzenia wiedzy dotyczącej przechowywanych składników krwi przeznaczonych do transfuzji, odgrywa znaczącą rolę zarówno we wprowadzaniu nowych strategii przechowywania, jak i ulepszeniu już istniejących. Przedmiotem badań współczesnej transfuzjologii jest określenie zmian jakościowych i ilościowych w obrębie proteomu przechowywanych krwinek czerwonych, w porównaniu ze świeżo wyizolowanymi krwinkami (LIUMBRUNO i współaut. 2010). Wykazano, że

podczas przechowywania KKCz w roztworze wzbogacającym SAGM najczęściej zmian zachodzi w białkach cytoszkieletu krwinek (D'AMICI i współaut. 2007). Już po 7 dniach przechowywania zaobserwowano pojawianie się niskocząsteczkowych fragmentów degradacji białek, przede wszystkim białka prążka 4,2, ale także białek prążka 4,1 i 3 oraz spektryny. Ilość niskocząsteczkowych produktów fragmentacji białek cytoszkieletu zwiększała się wraz z czasem przechowywania, jednocześnie dochodziło do tworzenia się wysokocząsteczkowych agregatów białek (tworzenie wiązań krzyżowych w α - i β -spektrynie). Badania te ujawniły także, że zaobserwowane w białkach zmiany są konsekwencją procesów oksydacyjnych zachodzących na skutek działania reaktywnych form tlenu (RFT). RFT mogą powstawać w reakcji Fentona w obecności żelaza pochodzącego z hemu uwolnionej z przechowywanych krwinek hemoglobiny, źródłem RFT mogą być także leukocyty obecne w niewielkiej liczbie w KKCz.

Analizie proteomicznej poddawano także wytwarzane podczas przechowywania KKCz mikrocząstki (RUBIN i współaut. 2008) oraz supernatanty zebrane znad osadu krwinek. Supernatanty te zawierają białka i substancje aktywne uwalniane w czasie przechowywania z leukocytów i płytek krwi, czy też gromadzone metabolity, które mogą powodować degradację krwinek (ANNIS i współaut. 2005, SPARROW 2012). Dzięki proteomice możliwe jest poznanie nie tylko wpływu czasu przechowywania, ale również ocena oddziaływania płynów wzbogacających na metabolizm, jakość i żywotność krwinek czerwonych.

PODSUMOWANIE

W leczeniu wielu schorzeń niezbędna jest krew, jej składniki i produkty krwiopochodne, a zapotrzebowanie na te produkty stale rośnie. Długotrwałe przechowywanie składników krwi jest więc niezbędne w celu zapewnienia ich dostępności wszystkim chorym wymagającym transfuzji. Wyniki badań eksperymentalnych sugerują, że główną z przyczyn postępujących zmian metabolicznych, biochemicznych, biofizycznych i funkcjonalnych zachodzących w krwinkach czerwonych przechowywanych *ex vivo* są przyspieszone i/lub nie fizjologiczne procesy starzenia się tych komórek. Zrozumienie mechanizmów

starzenia się krwinek czerwonych, jak również związanych z procesami starzenia zmian w metabolizmie i funkcjonowaniu krwinek może być kluczem do opracowania metod zapobiegania lub zmniejszania niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. Wyzwaniem współczesnej transfuzjologii jest poszukiwanie coraz skuteczniejszych roztworów do podtrzymywania metabolizmu i ochrony krwinek czerwonych podczas długotrwałego przechowywania w celu zachowania funkcji komórek po transfuzji, jak również nowych, czułych metod umożliwiających stałą kontrolę jakości składników krwi.

KONCENTRATY KRWIWEK CZERWONYCH W TRANSFUZJOLOGII

Streszczenie

Przetaczanie koncentratów krwinek czerwonych (KKCz) jest istotnym elementem współczesnej opieki medycznej. W KKCz przechowywanych standardowo w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa (do 42 dni, 1–6°C) zachodzą jednak postępujące zmiany metaboliczne, biochemiczne, biomechaniczne i funkcjonalne, przejawiające się ostatecznie utratą ich żywotności. Zmiany te spowodowane są naturalnym obniżaniem się stężenia różnych związków chemicznych i towarzyszą procesowi starzenia się krwinek. Napromienianie KKCz, obecnie jedyna uznana metoda zapobiegania poprzetoczeniowej chorobie prze-

szczep przeciwko biorcy, skraca czas ich przechowywania do 28 dni. Przetaczanie składników krwi zawsze wiąże się z ryzykiem wystąpienia różnego typu niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych. W świetle pytań klinicystów o bezpieczeństwo przechowywanych KKCz ważne jest opracowanie nowych płynów wzbogacających zapobiegających procesom starzenia się krwinek oraz nowych metod kontroli ich jakości. Obecnie, proteomika oferuje metody dokładniejszego poznania właściwości i funkcji przechowywanych krwinek czerwonych.

STORED RED BLOOD CELLS IN TRANSFUSION MEDICINE

Summary

Red blood cell transfusion is an important element of modern medical care. However, during conventional blood bank storage red blood cells undergo progressive metabolic, biochemical, biomechanical and functional changes, leading to their aging and finally to loss of viability. Irradiation of cellular blood components, currently the only accepted method to prevent transfusion-associated graft-versus host disease, reduces the storage time to 28 days. Transfusion of blood com-

ponents is always associated with the risk of various unwanted after-effects. Under the pressure of clinical questions about the safety of stored red blood cells it is important to develop new storage conditions preventing red blood cell aging and new methods for the control of the quality of the stored cells. Presently, proteomics offers approaches for deeper understanding of the properties and function of stored red blood cells.

LITERATURA

- AGARWAL P., RAY V. L., CHOUDHURY N., CHAUDHARY R. K., 2005. *Effect of pre-storage gamma irradiation on red blood cells*. Ind. J. Med. Res. 122, 385–387.
- ALMAC E., INCE C., 2007. *The impact of storage on red cell function in blood transfusion*. Best Practic. Res. Clin. Anaesthesiol. 21, 195–208.
- ANNIS A. M., GLENISTER K. M., KILLIAN J. J., SPARROW R. L., 2005. *Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products*. Transfusion 9, 1426–1433.
- BOSMAN G. J. C. G., WERRE J. M., WILLEKENS F. L. A., NOVOTNY V. M. J., 2008. *Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion*. Transfusion Med. 18, 335–347.
- BROJER E., 2008. *Immunomodulacja zależna od transfuzji (TRIM) – realne zjawisko biologiczne udokumentowane w badaniach podstawowych o nieudowodnionej szkodliwości klinicznej*. Acta Haematol. Pol. 4, 687–696.
- BUX J., SACHS U. J. H., 2007. *The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI)*. Brit. J. Haematol. 136, 788–799.
- D'AMICI G. M., RINALDUCCI S., ZOLLA L., 2007. *Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage*. J. Proteom. Res. 6, 3242–3255.
- GHATPANDE S. S., CHOUDHARY P. K., QUINN C. T., GOODMAN S. R., 2008. *Pharmaco-proteomic study of hydroxyurea-induced modifications in the sickle red blood cell membrane proteome*. Exp. Biol. Med. 233, 1510–1517.
- GMEREK K., FABIJANSKA-MITEK J., 2011. *Potencjalne patogenne zmiany w krwinkach czerwonych podczas ich przechowywania*. Polski Merkuriusz Lekarski 30, 224–227.
- GOODMAN S. R., KURDIA A., AMMANN L., KAKHNIASHVILI D., DAESCU O., 2007. *The human red blood cell Proteome and interactome*. Exp. Biol. Med. 232, 1391–1408.
- HAJJAR A. L., AULER JUNIOR J. O. C., SANTOS L., GALAS F., 2007. *Blood transfusion in critically ill patients: State of the art*. Clinics 62, 507–524.
- HESS J. R., 2006. *An update on solutions for red cell storage*. Vox Sanguinis 91, 13–19.
- HESS J. R., 2010a. *Red cell storage*. J. Proteom. 73, 368–373.
- HESS J. R., 2010b. *Red cell changes during storage*. Transf. Apheresis Sci. 43, 51–59.
- HOGMAN C. F., MERYMAN H. T., 1999. *Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion*. Transf. Med. Rev. 13, 275–296.
- KAKHNIASHVILI D. G., BULLA L. A., GOODMAN S. R., 2004. *The human erythrocyte proteome: Analysis by ion trap mass spectrometry*. Mol. Cell. Proteom. 3, 501–509.
- KLEIN H. G., SPAHN D. R., CARSON J. L., 2007. *Red blood cell transfusion in clinical practice*. Lancet 370, 415–426.
- KOCH C. G., LI L., SESSLER D. I., FIGUEROA P., HOELTGE G. A., MIHALJEVIC T., BLACKSTONE E. H., 2008. *Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery*. New Engl. J. Med. 358, 1229–1239.
- KOR D. J., GAJIC O., 2010. *Blood product transfusion in the critical care setting*. Curr. Opin. Crit. Care 16, 309–316.

- LACHERT E., 2005. *Zapewnienie jakości krwi i jej składników we współczesnym krwiodawstwie*. Laboratorium 4, 44-48.
- LACHERT E., ANTONIEWICZ-PAPIS J., 2010. *Metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi*. J. Transf. Med. 3, 112-119.
- LIUMBRUNO G., D'AMICI G. M., GRAZZINI G., ZOLLA L., 2008. *Transfusion medicine in the era of proteomics*. J. Proteom. 71, 34-45.
- LIUMBRUNO G., D'ALESSANDRO A., GRAZZINI G., ZOLLA L., 2010. *How has proteomics informed transfusion biology so far?* Crit. Rev. Oncol. Hematol. 76, 153-172.
- LOW T. Y., SEOW T. K., CHUNG M. C. M., 2002. *Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry*. Proteomics 2, 1229-1239.
- ŁĘTOWSKA M., ROSIEK A., 2006. *Stosowanie komórkowych składników krwi i onkologii*. Onkologia w Praktyce Klinicznej 2, 6-17.
- ŁĘTOWSKA M., ŻUPAŃSKA B., 2009. *Współczesne poglądy na niektóre powikłania poprzetoczeniowe*. Acta Haematol. Pol. 40, 407-423.
- MEYER E. K., DUMONT D. F., BAKER S., DUMONT L. J., 2011. *Rejuvenation capacity of red blood cells in additive solutions over long-term storage*. Transfusion 51, 1574-1579.
- MOROFF G., LUBAN N. L. C., 1997. *The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease: Technical issues and guidelines*. Transf. Med. Rev. 11, 15-26.
- OFFNER P. J., 2004. *Age of blood: does it make a difference?* Crit. Care 8, S24-S26.
- PASINI E. M., KIRKEGAARD M., MORTENSEN P., LUTZ H. U., THOMAS A. W., MANN M., 2006. *In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells*. Blood 108, 791-801.
- PAVENSKI K., SAIDENBERG E., LAVOIE M., TOKESSY M., BRANCH D. R., 2012. *Red blood cell storage lesions and related transfusion issues: A canadian blood services research and development symposium* Transf. Med. Rev. 1, 68-84.
- PELESZYŃSKI M., MOROFF G., LUBAN N., TAYLOR B., QUINONES R., 1994. *Effect of gamma irradiation of red blood cell unit on T-cell inactivation as assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host-disease*. Blood 83, 1683-1689.
- RADZIWIŃ P., 2009. *Czy przetocznie długo przechowywanego koncentratu krwinek czerwonych zwiększa chorobowość i śmiertelność biorcy?* Acta Hematologica Polonica 40, 397-406.
- ROUX-DALVAI F., DE PEREDO A. G., SIMO C., GUERRIER L., BOUYSSIE D., ZANELLA A., CITTERIO A., BURLET-SCHILTZ O., BOSCHETTI E., RIGHETTI P. G., MONSARRAT B., 2008. *Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry*. Mol. Cell. Proteom. 7, 2254-2269.
- RUBIN O., CRETZAZ D., CANELLINI G., TISSOT J. D., LION N., 2008. *Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools*. Vox Sanguinis 95, 288-297.
- RUDMANN S., 2005. *Textbook of blood banking and transfusion medicine*. Saunders.
- RYBAKOWSKI M., WITT M., JUSKOWIAK K., MAŁKIEWICZ T., BARANOWSKI M., ŚLÓSAREK R., 2012. *Hiperkaliemia jako bezpośredni stan zagrożenia życia. Wczesne postępowanie lecznicze w oparciu o wytyczne europejskiej i polskiej rady resuscytacji 2010*. Nowiny Lekarskie 81, 658-663.
- SCOTT K. L., LECAK J., ACKER J. P., 2005. *Biopreservation of red blood cells: Past, present, and future*. Transf. Med. Rev. 19, 127-142.
- SPARROW R. L., 2012. *Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: a role for "omics" analyses*. Blood Transf. 10, 7-11.
- SPINELLA P. C., CARROLL C. L., STAFF I., GROSS R., MC QUAY J., KEIBEL L., WADE C. E., HOLCOMB J. B., 2009. *Duration of red blood cell storage is associated with increased incidence of deep vein thrombosis and in hospital mortality in patients with traumatic injuries*. Crit. Care 13, R151.
- STOWELL C. P., 2010. *Effects of storage on the biology and clinical efficacy of the banked red blood cell*. Transf. Apheresis Sci. 43, 45-47.
- TRIULZI D. J., YAZER M. H., 2010. *Clinical studies of the effect of blood storage on patient outcomes*. Transf. Apheresis Sci. 43, 95-106.
- TSAI A. G., HOFMANN A., CABRALES P., INTAGLIETTA M., 2010. *Perfusion vs. oxygen delivery in transfusion with "fresh" and "old" red blood cells: The experimental evidence*. Transf. Apheresis Sci. 43, 69-78.
- VEALE M. F., HEALEY G., SPARROW R. L., 2011. *Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature*. Transfusion 51, 25-33.
- ZAREMBA M., FRANEK E., RYDZEWSKI A., 2006. *Hiperkaliemia*. Choroby Serca i Naczyń 1, 36-40.