

©Borgis

Katarzyna Gmerek^{1,2}, *Jadwiga Fabijańska-Mitek¹

Zmiany zachodzące w krwinkach czerwonych przechowywanych w bankach krwi**

Alterations of red blood cells stored in blood banks

¹Zakład Immunohematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa
Kierownik Zakładu: dr hab. med. Jadwiga Fabijańska-Mitek

²Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie
Kierownik Centrum: lek. med. Dariusz Piotrowski

Słowa kluczowe

przechowywanie krwinek czerwonych,
starzenie krwinek czerwonych,
leukoredukcja, fagocytoza krwinek
czerwonych, hemoliza

Keywords

RBCs storage, RBCs aging,
leucoreduction/leucodepletion,
phagocytosis of RBCs, haemolysis

Adres/address:

*Jadwiga Fabijańska-Mitek
Zakład Immunohematologii CMKP
ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa
tel. +48 (22) 569-38-20
fax +48 (22) 569-38-29
immunohematologia@cmkp.edu.pl

Streszczenie

Eryocyty jako jednostki koncentratu krwinek czerwonych przechowywane w bankach krwi maksymalnie przez 42 dni. Niektóre statystyczne badania kliniczne sugerowały, że takie „stare” krwinki czerwone mogą być szkodliwe dla pacjentów, np. dla chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi. Krwinki czerwone podczas przechowywania tracą własności reologiczne i zdolność uwalniania tlenu, ponieważ spada stężenie ATP, 2,3-DPG i NO. Badacze oceniają zmiany biochemiczne zachodzące wewnątrz erytrocytów, w ich błonach komórkowych i w środowisku, w którym są przechowywane. Zwraca się uwagę na zmiany w krwinkach czerwonych przechowywanych w obecności leukocytów oraz filtrowanych. Prezentowana praca jest przeglądem licznych publikacji, w tym własnych badań dotyczących starzenia się krwinek czerwonych i możliwego znaczenia dla biorców krwi. Podczas przechowywania erytrocytów obserwowaliśmy zmiany niektórych cząstek błonowych związanych z adhezją, transportem tlenu, regulacją układu dopełniacza i procesem starzenia, takich jak: CD44, CD47, CD55, CD59, CD235a (stosując technikę cytometrii przepływową) i swoistych antygenów z układów Rh, Kidd, Duffy, MNS (stosując aglutynacyjną technikę żelową).

Summary

The erythrocytes as units of packed RBCs are stored in blood banks for up to 42 days. Some statistical clinical trials suggested that such „old” RBCs may be harmful to patients, e.g. for these with acute coronary syndromes. RBCs during the storage period change their rheological properties and the ability of oxygen release since the concentration of ATP, 2,3-DPG and NO decreased. Researchers evaluate biochemical changes occurring within the erythrocytes, in their cell membranes and in the environment in which they are stored. They focus attention on the changes of RBCs stored with leukocytes and without them after leucoreduction. The present work is a review of numerous publications, including our own research on aging RBCs and the possible significance for blood recipients. We observed changes of some membrane molecules associated with adhesion, oxygen transport, complement regulation and senescent process during the storage period such as: CD44, CD47, CD55, CD59, CD235a (using flow cytometry technique) and specific antigens of Rh, Kidd, Duffy, MNS blood group systems (using gel agglutination technique).

PRZECHOWYWANIE KRWI

Biorcom krwi nie przetacza się krwi pełnej, tylko te składniki komórkowe – osocze lub preparaty osoczopochodne – które są im potrzebne. Stosuje się: koncentrat krwinek czerwonych (KKCz), koncentrat krwinek płytkowych (KKP) oraz świeżo mrożone osocze (ang. *fresh frozen plasma* – FFP), wyjątkowo koncentrat granulocy-

tów (KG). Z osocza produkuje się albuminę, immunoglobuliny i czynniki krzepnięcia. Warunki przechowywania – różne dla poszczególnych składników – gwarantują ich wysoką jakość w maksymalnie długim czasie (1). Dla ustanowienia obowiązujących standardów, pozwalających na preparatykę krwi, czyli rozdział na poszczególne składniki, a potem ich przechowywanie, zasadnicze znaczenie mia-

**Praca finansowana z grantu CMKP nr 501-1-26-01-13

to zastosowanie pojemników z tworzyw sztucznych z roztworami konserwującymi i wzbogacającymi (1-3). Najczęściej stosowanym w transfuzjologii składnikiem krwi są krwinki czerwone. Jeżeli KKCz zostanie poddany procesowi filtracji, to uzyskuje się ubogoleukocytarny koncentrat krwinek czerwonych (UKKCz). KKCz przechowuje się w temperaturze 2-6°C maksymalnie przez 42 dni, a filtracja nie wpływa na długość czasu przechowywania. W Polsce koncentraty krwinek czerwonych uzyskuje się najczęściej po pobraniu krwi dawcy do pojemnika z płynem konserwującym CPD (cytrynian trójsodowy – antykoagulant, glukoza – składnik odżywczy, kwas cytrynowy – konserwant, dwuwodorofosforan sodowy – bufor), w zestawie zawierającym dodatkowy pojemnik z roztworem wzbogacającym. Dodaje się go do krwinek czerwonych po wirowaniu i oddzieleniu kożuszka leukocytarno-płytkowego oraz osocza do innych satelitarnych pojemników zestawu. W Polsce najczęściej stosuje się roztwór wzbogacający SAGM (sól – roztwór NaCl, adenina, glukoza i mannitol) (1). Można w nim przechowywać KKCz lub UKKCz przez 42 dni. Termin ten, podobnie jak inne, krótsze terminy w przypadku innych roztworów, ustalono na podstawie badań *in vitro* cech morfologicznych i biochemicznych krwinek czerwonych oraz *in vivo*, oceniając ich przeżycie po przetoczeniu zdrowym wolontariuszom. Przyjęto za wystarczające przeżycie 75% krwinek czerwonych w krążeniu biorcy po 24 godzinach od transfuzji (4, 5). Pomiaru dokonuje się podając krwinki autologiczne znakowane izotopem (pomiar promieniowania) albo krwinki allogeniczne różniące się od biorcy antygenem (pomiar metodą cytometrii przepływowej). Zastosowanie omówionych, przykładowych roztworów oraz pojemników z polichlorku winylu oraz tzw. plastyfikatorów, dodatkowo stabilizujących błony komórkowe erytrocytów, pozwoliło na rozdzielanie krwi pełnej na składniki komórkowe i osocze w systemie zamkniętym oraz automatyzację procesu preparatyki krwi (1, 6). Gospodarowanie krwią stało się bardziej efektywne w porównaniu z okresem, gdy stosowano krótsze terminy przechowywania, czyli 21 i 35 dni. Czterdziestodwudniowy termin ważności KKCz zwiększa ich dostępność przy jednoczesnym ograniczeniu strat.

EWENTUALNE NIEKORZYSTNE SKUTKI PRZETACZANIA PRZECHOWYWANYCH KRwinek CZERWONYCH

W ostatnich kilkunastu latach opublikowano prace kliniczne, w których przedstawiono wyniki sugerujące możliwość wystąpienia niepożądanych skutków transfuzji zależnych od czasu przechowywania KKCz i ilości zawartych w nim leukocytów. Najwięcej prac dotyczyło pacjentów oddziałów kardiologicznych, w tym chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi. Są oni szczególnie wrażliwi na niedotlenienie, hemolizę, zaburzenia elektrolitowe, zaburzenia w układzie krzepnięcia oraz obecność czynników prozapalnych (7-10). Przeprowadzono liczne badania retrospektywne dotyczące setek, a nawet tysięcy chorych. Ich dane kliniczne poddano testom statystycznym i opisano niekorzystne objawy związane z transfuzjami (4, 11-14). Porównywano pacjentów

w grupach, w których przetaczano lub nie przetaczano KKCz oraz w grupach, w których przetaczano UKKCz świeże i KKCz długo przechowywane. Zazwyczaj analizowano następujące parametry kliniczne: śmiertelność, długość hospitalizacji, zaburzenia krzepnięcia, niewydolność nerek, zakażenia łącznie z sepsą oraz ostre nieimmunologiczne poprzetoczeniowe uszkodzenie płuc (ang. *transfusion-related acute lung injury* – TRALI).

Zauważono, że powikłania występowały statystycznie częściej po przetoczeniu jednostek KKCz długo przechowywanych oraz niefiltrowanych, czyli niezubożonych w leukocyty. Sugerowano następujące przyczyny powikłań: 1) obecność cytokin uwalnianych z leukocytów, histaminy i innych bioaktywnych substancji, które mogą zainicjować proces zapalny, 2) obecność ziarnistości płytek krwi zwiększających krzepnięcie, 3) zaburzenia elektrolitowe, szczególnie nadmiar jonów potasu bezpośrednio oddziałujący na pracę serca, 4) zwiększenie powinowactwa erytrocytów do tlenu i zmniejszone uwalnianie go do tkanek, 5) upośledzenie wytwarzania oraz transportu tlenku azotu (NO) i tym samym jego udziału w rozszerzaniu naczyń włosowatych i dowozie tlenu do tkanek (15-19). Inne przyczyny mogły być istotne także dla innych grup pacjentów, a szczególnie dla chorych z obniżoną odpornością. Obserwowano większe ryzyko zakażeń prowadzących do wielonarządowych i śmiertelnych powikłań po transfuzjach długo przechowywanych KKCz (18-21). Większość drobnoustrojów nie przeżywa podczas przechowywania w niskiej temperaturze, są jednak gatunki bakterii, np. *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica* i *Aeromonas* sp., które stopniowo namnażają się w temperaturze lodówki. Obliczono, że z pojedynczej komórki po 27 dniach powstaje 10⁸ komórek potomnych (4, 22). Dodatkowo hemoliza części przetoczonych krwinek czerwonych wpływa na zwiększenie stężenia żelaza, które działa stymulująco na wzrost bakterii (18). Dla zespołu różnych zmian w odpowiedzi odpornościowej wprowadzono pojęcie zależnej od przetoczeń immunomodulacji, określanej skrótem TRIM (ang. *transfusion-related immunomodulation*). Może się ona objawiać między innymi zwiększonym ryzykiem zakażeń pooperacyjnych, ale także stymulacją choroby nowotworowej, choć opinie w tym zakresie nie są jednoznaczne (11, 23).

Prowadzono też badania prospektywne, ale są one nieliczne (8, 24). Niektórzy autorzy ustalili 5. dzień jako termin, do którego krwinki czerwone można traktować jako „świeże”, inni 8., 10. lub 14. dzień (8, 24-26). Liczby dni, po których krwinki nazywano „starymi”, to 15., 20., 21., 28. lub 40.-42. dzień od pobrania (11, 14, 26). Autorzy publikacji wykazywali różnice w powikłaniach potransfuzyjnych po przetaczaniu takich erytrocytów.

Niektórzy autorzy wskazywali, że brak jest związku między okresem przechowywania krwinek czerwonych oraz obecnością leukocytów a stanem klinicznym pacjentów (27, 28). W pracy przeglądowej dotyczącej 103 publikacji prezentujących retrospektywne badania kliniczne podano w wątpliwość wyciągane w nich wnioski (29). Wykazano, że są liczne pułapki metodyczne w analizie tych badań. Zauważono też, że prace potwierdzające nieko-

rzystny wpływ przetaczania „starych” KKCz na pacjentów, w stosunku do przetaczania „świeżych” UKKCz, dotyczyły przede wszystkim doniesień z Ameryki Północnej (USA, Kanada), co mogło się wiązać z innymi procedurami preparatyki, stosowaniem innych roztworów, plastyfikatorów itp. niż w Europie. Zaproponowano przeprowadzenie prospektywnych badań międzykontynentalnych.

ZMIANY BIOCHEMICZNE ZACHODZĄCE W KRWINKACH CZERWONYCH

Zespoły badawcze w różnych krajach poszukiwały zmian zachodzących w krwinkach czerwonych podczas ich starzenia się *in vivo* i *ex vivo*, badając materiał kliniczny i laboratoryjny oraz wykonując doświadczalne transfuzje u zwierząt (30). Poznano niektóre zmiany biochemiczne i czynnościowe zachodzące w koncentratkach krwinek czerwonych podczas przechowywania i podzielono je na dwie grupy: 1) dotyczące erytrocytów, między innymi: obniżenie stężenia związków energetycznych ATP i 2,3-DPG (2,3-bifosfoglicerynian), tym samym zwiększenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu; utlenianie białek związanych z błoną komórkową; wzrost niestabilności osmotycznej i hemolizy; powstawanie i usuwanie mikropercherzyków oraz obniżenie zdolności erytrocytów do odkształcania; 2) związane ze środowiskiem, w którym erytrocyty są przechowywane, głównie: wzrost stężenia jonów wodoru, potasu, wapnia, żelaza, obecność mikropercherzyków uwalnianych z erytrocytów, białek erytrocytarnych, lipidów, mleczanów, cytokin (31).

Związki energetyczne: ATP i 2,3-DPG

Obecność ATP odpowiada za aktywność metaboliczną krwinki czerwonej oraz warunkuje utrzymanie jej charakterystycznego dyskooidalnego, dwuwklęsłego kształtu oraz zdolności do wielokrotnego odkształcania się, czyli elastyczności niezbędnej do zachowania żywotności i pełnienia funkcji transportowych (32). Wysokie stężenie ATP pozwala zachować aktywność enzymu translokazy aminofosfolipidowej odpowiedzialnej za utrzymanie wewnątrz krwinki fosfatydyloseryny – związku, którego pojawienie się na powierzchni erytrocytu jest sygnałem do fagocytozy erytrocytu przez makrofagi. W czasie pobierania krwi stężenie ATP w krwince czerwonej wynosi zazwyczaj około $4 \pm 1 \mu\text{M/g Hb}$. Wartość ta wzrasta do $5 \pm 1 \mu\text{M/g Hb}$ w pierwszym tygodniu przechowywania, co jest związane ze spadkiem poziomu 2,3-DPG i następnie obniża się ze względu na pogorszenie warunków do syntezy ATP. Pod koniec szóstego tygodnia przechowywania w konwencjonalnych roztworach dla KKCz, stężenie ATP w krwinkach czerwonych wynosi tylko $1-3 \mu\text{M/g Hb}$. Ponieważ związek ten bierze przede wszystkim udział w reinicjacji glikolizy, to jego stężenie w końcowym okresie przechowywania KKCz określa również szybkość odzyskiwania niektórych funkcji przetoczonych erytrocytów (33).

Związek 2,3-DPG powstaje w wyniku glikolizy bez-tlenowej w erytrocytach (17). Wiąże się specyficznie z hemoglobina, obniżając jej powinowactwo do tlenu, a zwiększając zdolności uwalniania go w tkankach (przesunięcie krzywej dysocjacji w prawo). Powinowactwo

do tlenu wzrasta, kiedy zawartość 2,3-DPG obniża się. W tych warunkach występuje trudniejsze uwalnianie tlenu w tkankach (przesunięcie krzywej dysocjacji w lewo). Stopniowe obniżanie się zdolności przenoszenia tlenu do tkanek przez krwinki przechowywane przez dłuższy czas w płynie konserwującym wynika głównie ze spadku stężenia 2,3-DPG (3, 7, 24). Obniża się ono w erytrocytach z około 15 do $1-2 \mu\text{M/g Hb}$ po 2-4 tygodniach przechowywania (33). Po godzinie od przetoczenia KKCz poziom 2,3-DPG w erytrocytach dawcy wynosi 25-30% poziomu w erytrocytach autologicznych biorcy, po dobie stanowi 50-70% tego poziomu, a jego całkowity odzysk może trwać nawet tydzień (15).

Na początku przechowywania pH w środowisku KKCz wynosi ok. 7,05 i po sześciu tygodniach obniża się do 6,4. Spadek pH jest szybszy w pierwszych tygodniach przechowywania. W ciągu sześciu tygodni powstaje około 8 mEq H^+ , które są w dużej mierze buforowane przez aminowe grupy lizyny hemoglobiny zawartej w erytrocytach. Około jednej czwartej powstającego kwasu węglowego ulega buforowaniu przez wodorowęglan, a powstający dwutlenek węgla dyfunduje z pojemnika (33). pH środowiska mniejsze niż 7,2 sprzyja rozpadowi 2,3-DPG, jednocześnie prowadząc do przestawienia produkcji ATP na inny szlak glikolizy z udziałem kinazy pirogronianowej. Konsekwencją jest utrzymujący się na początku przechowywania wzrost stężenia ATP (ale nie 2,3-DPG), który później obniża się. Metabolizm erytrocytów ulega ograniczeniu, a tempo zużycia glukozy spada poniżej 50% w porównaniu do świeżej krwi. Obowiązująca temperatura przechowywania KKCz $2-6^\circ\text{C}$ obniża aktywność ATP-zależnej błonowej pompy sodowo-potasowej. Wynikiem tego jest wzrost stężenia K^+ w środowisku przechowywania. Stężenie zewnątrzkomórkowego K^+ w pojemniku z krwią wzrasta w tempie około 1 mEq/L/dzień . Po transfuzji stężenie jonów K^+ w krwinkach może normalizować się nawet do 4 dni (29).

Znaczenie NO

W warunkach fizjologicznych erytrocyty żyją w krążeniu około 120 dni. W tym czasie niektóre składniki ulegają uszkodzeniom aż do krytycznego poziomu, po przekroczeniu którego krwinki są usuwane przez makrofagi śledziony. Uszkodzenia tlenowe powodują mniejszą ich odporność na stres, co przejawia się uwalnianiem hemoglobiny, jonów potasu i wewnątrzkomórkowych enzymów, np. dehydrogenazy mleczanowej (34, 35). Zmiany biochemiczne w krwinkach czerwonych mogą wpływać na uwalnianie i działanie tlenku azotu (NO). Związek ten pełni jedną z kluczowych ról w dostarczaniu tkankom tlenu, gdyż powoduje rozszerzanie drobnych naczyń krwionośnych i ułatwia przepływ erytrocytów. Dodatkowo odgrywa istotną rolę w hemostazie, hamując agregację oraz adhezję krwinek płytkowych i monocytów do śródbłonka. Wcześniej obecność NO wiązano głównie ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych, ale później wykryto go w błonie komórkowej i cytoplazmie erytrocytów (19, 36). Tetramery hemoglobiny wiążą NO, tworząc SNO-Hb. Przepływając przez tkanki, tlen uwalnia się z hemoglobiny, a struktura

oksyhemoglobiny zmienia się w deoksyhemoglobinę. Zwiększa się uwalnianie NO, który wnika do mięśni gładkich tętniczek i powoduje rozszerzenie naczyń. Wiązanie SNO-Hb jest niestabilne i ma czas półtrwania 16 godzin. W przechowywanych krwinkach jego poziom spada i potrzeba kilku godzin do powrotu do wartości obecnych w krwinkach czerwonych biorcy (37).

Wraz z czasem przechowywania zwiększa się tempo hemolizy, co jest spowodowane pogarszającymi się warunkami wewnątrz pojemnika (33). Zgodnie z obowiązującymi w Polsce standardami jakości, hemoliza na koniec dopuszczalnego czasu przechowywania nie może stanowić więcej niż 0,8% krwinek. Na skutek hemolizy zmniejsza się biodostępność NO. Nawet niski poziom wolnej hemoglobiny w osoczu jest wystarczający do zahamowania sygnalizacji śródbłonkowego NO oraz wywołania skurczu naczyń i nadciśnienia. Wolna hemoglobina reaguje z NO trzy razy szybciej niż Hb zawarta w mikropęcherzykach i około 1000 razy szybciej od zawartej w erytrocytach. Hemoliza powoduje również uwalnianie arginazy 1, czyli enzymu czerwonekrwinkowego przekształcającego argininę (substrat dla NO) w ornitynę, przyczyniając się do zmniejszenia dostępności NO i dysfunkcji układu krążenia (36, 38). Najwięcej krwinek czerwonych jest usuwanych z krążenia w ciągu pierwszej godziny po transfuzji. Jedna jednostka KKCz zawiera 220-250 mg żelaza. W związku z tym, szybkie usuwanie erytrocytów po przetoczeniu dostarcza dużej ilości żelaza z hemoglobiny do makrofagów. Istnieje zależność pomiędzy stężeniem żelaza wewnątrzkomórkowego w makrofagach oraz poziomem uwolnionych cytokin i reakcją zapalną. Natomiast wzrost stężenia wolnego żelaza niezwiązanego z transferyną (ang. *non-transferrin bound iron* – NTBI) powoduje odkładanie go w tkankach wątroby, śledziony i nerek. Zwiększa się ryzyko odpowiedzi zapalnej i niewydolności narządowej. NTBI bierze również udział w reakcjach utleniania i redukcji, prowadząc do uszkodzenia oksydacyjnego, cytotoxyczności i zwiększenia ekspresji śródbłonkowych cząsteczek adhezyjnych (18).

ZMIANY MORFOLOGICZNE BŁONY KOMÓRKOWEJ KRwinek CZERWONYCH

Prawidłowe krwinki czerwone mają kształt dwuwklęsłego dysku o średnicy 7-8 μm i objętości około 90 fl. Posiadają około 50% więcej błony niż gdyby miały kształt kulisty. Ten nadmiar umożliwia zdolność odkształcania się erytrocytów i przechodzenia przez naczynia włosowate narządów i małe naczynia śledziony, których średnica jest mniejsza od ich średnicy. Utrata błony jest częścią procesu dojrzewania, w trakcie którego retikulocyty o objętości 140 fl stają się erytrocytami o objętości 90 fl. Dalsza utrata błony komórkowej jest również elementem starzenia się krwinek oraz wiąże się ze zmianą ich kształtu podczas przechowywania, od gładkich dwuwklęsłych dysków przez echinocyty (dzwukłęsłe dyski z wypustkami) do sferoechinocytów (kule z wypustkami). Po powrocie do normalnych stężeń ATP, 2,3-DPG, Na, K i Ca krwinki również przyjmują typowy kształt. Jednak poza wczesnym stadium sferoechinocytu, utrata błony erytrocytu w postaci mikropęcherzyków powstających z wypustek echinocytów jest

nieodwracalna. Krwinki czerwone nie mają mechanizmu odnowy utraconej błony komórkowej. Sądzi się, że pod koniec okresu przechowywania najstarsze komórki tracąc ją częściowo stają się sztywnymi kulami o średnicy 5,6 μm . Przechowywana krwinka traci jednak mniej niż 1/3 błony komórkowej (33). Mikropęcherzyki pozostające w środowisku KKCz mogą być miarą uszkodzenia krwinek czerwonych i potencjalnych niepożądanych skutków po transfuzji. Ostatnio są przedmiotem zainteresowania różnych badaczy, w tym transfuzjologów (33, 38, 39).

Podczas starzenia się erytrocytów w organizmie, oksydacyjne uszkodzenia białka pasma 3 oraz glikoforyn prowadzą do powstania antygenów starzenia i do usuwania krwinek czerwonych za pośrednictwem naturalnych autoprzeciwciał (40-42). Z kolei tlenowe uszkodzenia spektryny stopniowo osłabiają cytoszkielet, a w cytozolu dochodzi do powolnej inaktywacji enzymów krwinek czerwonych. Zmiany na powierzchni krwinki czerwonej dotyczą też węglowodanów. Proste reakcje rozpadu takie jak utrata kwasu sialowego z powierzchniowych glikolipidów i glikoprotein mogą powodować odstąpienie głębiej ukrytych determinant antygenowych (43). Utrata cukrów może zwiększać adhezję krwinek do śródbłonka. Z kolei w środowisku podwyższonego poziomu cukru podczas przechowywania KKCz w roztworach konserwujących może dochodzić do przyłączania cukru i powstawania końcowych produktów zaawansowanej glikacji (33, 44). Czas przechowywania KKCz może wpływać na wzrost adhezji krwinek do komórek śródbłonka naczyń, co może zakłócić lokalny przepływ krwi i zmniejszyć dostarczanie tlenu do tkanek oraz doprowadzić do niedrożności mikrokrążenia (4, 45). Na zwiększoną adhezję krwinek wpływają zarówno parametry biochemiczne, jak i morfologiczne, charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego (30).

WPLYW KRwinek BIAŁYCH NA KRwineki CZERWONE I LEUKOREDUKCJA

Leukocyty obecne w niefiltrowanych KKCz rozpadają się i uwalniają enzymy: proteazy, lipazy i glikozydazy, które mogą wpływać na strukturę zewnętrznej powierzchni błon erytrocytów i pogłębiać uszkodzenia. Glikozydazy usuwają cukry z glikolipidów i glikoprotein. Jak wspomniano wcześniej, zdaniem niektórych autorów utrata tych cukrów może zwiększać przyczepność krwinek czerwonych do śródbłonka, co z kolei może przyczynić się do zapalenia śródbłonka, a następnie do uwolnienia Fe z hemu rozpadających się erytrocytów. W tej sytuacji skuteczną metodą ograniczającą uszkodzenia enzymatyczne i tym samym hemolizę przechowywanych krwinek byłaby leukoredukcja, czyli usuwanie białych krwinek przez filtrację. W nadsączu KKCz przechowywanych z leukocytami i krwinkami płytkowymi kumulują się oprócz wyżej wspomnianych czynników także: histamina, składniki dopełniacza i cytokiny. IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α są obecne w KKCz niefiltrowanych, natomiast w procesie filtracji zwiększa się stężenie elastazy neutrofilii oraz TGF- β 1 (29). Mediatory zapalenia łącznie z bioaktywnymi ziarnistościami z krwinek płytkowych mogą odpowiadać za reakcje gorączkowe, za TRALI i TRIM (23, 46).

ZMIANY IMMUNOLOGICZNE I CZYNNOŚCIOWE BŁONY KOMÓRKOWEJ KRWINEK CZERWONYCH

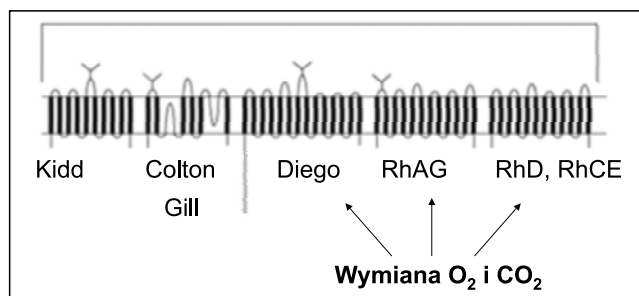
Procesy toczące się wewnątrz krwinek czerwonych oraz zmiany w ich środowisku podczas przechowywania oddziałują na błonę komórkową krwinek czerwonych. Zainteresowanie błoną erytrocytów w transfuzjologii najpierw wiązało się z jej aktywnością immunologiczną. Badania serologiczne były i są niezbędne dla bezpiecznego doboru krwinek czerwonych do transfuzji. Dotychczas umożliwiły odkrycie 342 antygenów w 35 układach grupowych (dwa ostatnie układy właśnie dołączyły do klasyfikacji) oraz w sześciu kolekcjach i dwóch seriach. Od kilkudziesięciu lat trwają prace nad poznaniem budowy biochemicznej antygenów i ich nośników, a od kilkunastu lat można odnotować szczególne zainteresowanie ich rolą biologiczną związaną z funkcjami życiowymi i utrzymaniem struktury krwinek czerwonych (17, 48, 49). Białka przechodzą przez podwójną warstwę fosfolipidową jeden lub kilka razy lub są przymocowane do niej za pomocą kotwicy, którą jest glikan fosfatydyloinozytolu (GPI) (50).

Ze względu na pełnione funkcje, białka te dzieli się na cztery kategorie: 1) transportery i kanały błonowe, 2) cząsteczki adhezyjne i receptory, 3) enzymy, 4) białka strukturalne łączące błonę z cytoszkieletem, odpowiedzialne za kształt i elastyczność krwinki. Niektóre mogą pełnić więcej niż jedną z tych funkcji. Funkcje białek różnych układów grupowych i cząsteczek różnicowania CD przedstawiają ryciny 1-3 (49).

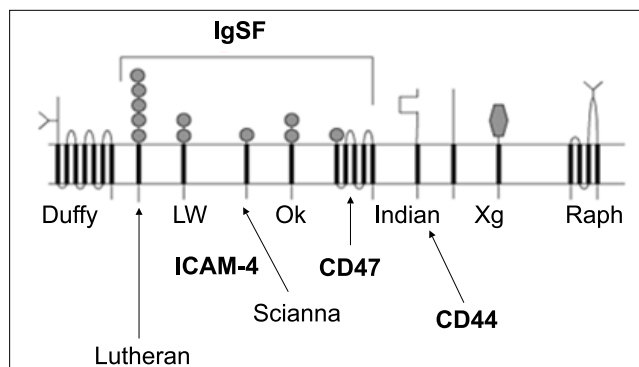
Glikoproteina układu grupowego Kidd jest uznawana za transporter mocznika. Glikoproteiny układów Colton i Gill to dwie z trzynastu znanych akwaporyn: AQP1 i AQP3, czyli kanałów wodnych. Z kolei glikoproteinom RhD, RhCE i RhAG, łącznie z białkiem pasma 3, czyli nośnikiem układu grupowego Diego, przypisuje się udział w wymianie gazowej – głównej funkcji krwinek czerwonych.

Glikoproteina układu grupowego Duffy pełni rolę receptorową. Wiąże chemokiny, ograniczając migrację leukocytów i proces zapalny. Jest znana jako receptor zarodźca malarii *Plasmodium vivax* oraz przypisuje się jej znaczenie w zakażeniu HIV. Funkcje receptorowe i adhezyjne mają też białka z nadrodziny immunoglobulin IgSF, o własnościach antygenowych układów: Lutheran, LW, Scianna i Ok oraz inne białka i związane z nimi antygeny układów: Indian, Xg, Raph. Szczególną uwagę zwracają cząsteczki: ICAM-4 – integryna biorąca udział w komunikacji międzykomórkowej, CD47 – cząsteczka intensywnie badana na różnych komórkach w związku z procesem starzenia i śmierci komórkowej oraz CD44 – cząsteczka adhezyjna, zaangażowana w procesy migracji i oddziaływań międzykomórkowych.

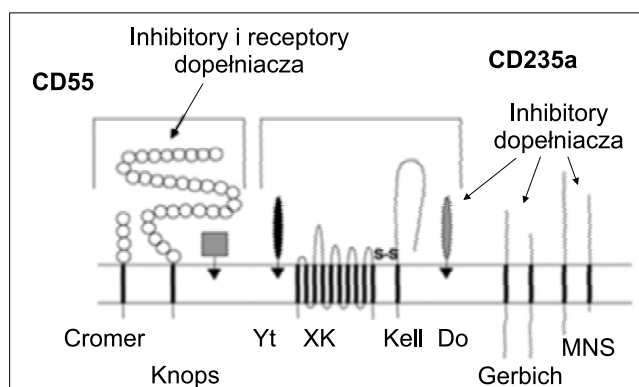
Do białek o funkcjach regulatorowych należy endopeptydaza Kell biorąca udział w erytropoezie oraz białko o swoistości antygenowej Cartwright (Yt) i aktywności acetylocholinesterazy. Przed hemolizą chronią krwinki czerwone białka będące inhibitorami dopełniacza związane z kotwicą GPI, układami Cromer i Dombrock oraz z cząsteczkami CD55 i CD59. CD55 zwany czynnikiem przyspieszającym rozpad (ang. *decay-accelerating factor* – DAF) blokuje kaskadę dopełniacza poprzez rozkła-



Ryc. 1. Błonowe transportery i kanały



Ryc. 2. Receptory i cząsteczki adhezyjne



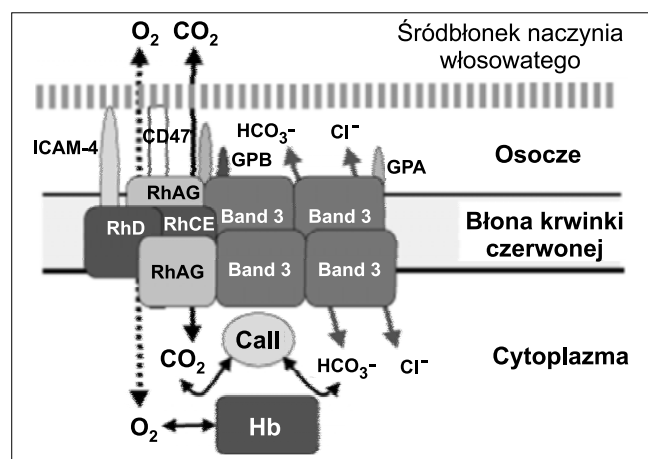
Ryc. 3. Enzymy i regulatory układu dopełniacza

danie enzymu konwertazy niezbędnej do przekształcania cząsteczki C3 do C3a, C3b, C3c i C3d oraz dalszego przebiegu procesu prowadzącego do hemolizy. CD59 jest antygenem nowego układu grupowego o tej samej nazwie. Zwany jest błonowym inhibitorem reaktywnej lizy (ang. *membrane inhibitor of reactive lysis* – MIRL), blokuje polimeryzację składnika C9, powstawanie kompleksu ataku na błonę komórkową C5b-C9 i w konsekwencji jej „podziurawienie”. Niedobory tych cząsteczek wpływają na hemolizę krwinek czerwonych oraz dodatkowo stymulują proces krzepnięcia, co widoczne jest u chorych na nocną napadową hemoglobinurię, posiadających populację krwinek czerwonych z defektem CD55 i CD59. Z kotwicą GPI związana jest też cząsteczka adhezyjna CD58, chociaż jej druga izoforma jest związana z białkiem transbłonowym. Znaczenie CD58 na krwinkach czerwonych nie jest znane, natomiast w przypadku krwinek jądrzastych przypisuje się tej cząsteczce udział w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych. W jednej publikacji

zwrócono uwagę, że ilość CD58 obniża się podczas przechowywania niefiltrowanych KKCz (48).

W procesach regulacyjnych układu dopełniacza może też uczestniczyć glikoforyna A – nośnik antygenów MN z układu grupowego MNS, nazywana również MIRL2, czyli drugi czynnik hamujący reaktywną lizę. Glikoforyny: GPA, GPB, GPC, GPD zawierają po dwie pary silnie glikozylowanych białek obecnych na krwinkach czerwonych. Stanowią one około 2% wszystkich białek błony komórkowej, a GPA oznaczana jako CD235a jest swoistą cząsteczką erytrocytów, charakterystyczną tylko dla tych komórek. Ze względu na wysoką zawartość kwasu sialowego cząsteczki GP mają zasadnicze znaczenie w utrzymaniu ujemnego ładunku błony komórkowej. Tym samym zapobiegają spontanicznej agregacji i aglutynacji krwinek czerwonych, modulują ich oddziaływanie z innymi krążącymi komórkami krwi oraz ze śródbłonkiem naczyń. Dodatkowo chronią erytrocyty przed uszkodzeniami mechanicznymi. GPA współuczestniczy w transporcie anionów oraz jest receptorem zarodźca malarii *Plasmodium falciparum*. GPA i innym glikoforynom przypisuje się rolę ochronną w niektórych zakażeniach wirusowych, sugerując, że mogą działać jako „wabiki, pułapki” (ang. *decoy*), wiążąc wirusy i uniemożliwiając ich replikację (50, 51).

Większość opisanych powyżej białek, nośników antygenów grupowych oraz cząsteczek CD uczestniczy w tworzeniu tak zwanego makrokompleksu błonowego pokazanego na rycinie 4, zwanego też makrokompleksem białka pasma 3. Białko to jest niezbędne do życia erytrocytu, a jego brak jest letalny (49, 52).



Ryc. 4. Makrokompleks białka pasma 3 zaproponowany w postaci diagramu przez Bruce'a i wsp. (50)

Cały makrokompleks bierze udział w procesie oddychania, a wszystkie składowe są powiązane strukturalnie i czynnościowo. Ta sieć oddziaływań jest niezbędna do wykonywania przez erytrocyt jego głównego zadania, czyli transportu tlenu i dwutlenku węgla (17). W obecności wody, pod wpływem enzymu anhidrazy węglanowej (Call) dwutlenek węgla ulega hydratacji do kwasu węglowego i powstają jony HCO₃⁻ i H⁺. Białko pasma 3 przenosi jony HCO₃⁻ poza komórkę wymieniając je na Cl⁻. Następnie jony H⁺ oddziałują na hemoglobinę, która uwalnia O₂. Ponieważ HCO₃⁻ jest lepiej rozpusz-

zalny niż CO₂, proces ten ułatwia transport CO₂ i uwalnianie O₂ w tkankach i jest odwrócony w płucach (49). N-końcowa domena cytoplazmatyczna białka pasma 3 wiąże hemoglobinę i enzymy glikolityczne. Makrokompleks białka pasma 3 z polipeptydami Rh działa jak metabolon wymiany O₂/CO₂, natomiast białko RhAG może być niespecyficznym kanałem dla tlenu i dwutlenku węgla. Cząsteczki adhezyjne, głównie ICAM-4 i CD47, mogą uczestniczyć w oddziaływaniu erytrocytu ze śródbłonkiem naczyń, ułatwiając wymianę gazową.

Kolejną ważną rolę makrokompleksu jest mocowanie błony erytrocytu do leżącego pod nią cytoszkieletu. Cytoszkielet krwinek czerwonych wraz z białkami błonowymi jest odpowiedzialny za utrzymanie integralności krwinek, zachowanie kształtu i elastyczności. Białko pasma 3 posiada wydłużoną N-końcową domenę przymocowaną do cytoszkieletu przez ankiryne oraz białka 4.2 i 4.1R. Osoby heterozygotyczne dla mutacji w genie białka pasma 3 często dziedziczą eliptycytozę, owalocytozę lub sferocytozę. Drugie miejsce przyłączenia obejmuje kompleks GPC, białko 4.1 i p55. GPC i GPD – glikoproteiny układu Gerbich mają C-końcowe domeny przyłączone do cytoszkieletu przez białko 4.1R i p55. Białko RhAG współdziała z ankiryne, białkami antygenów Lu i Xk, ze spektryną i CD44 oraz z białkiem 4.1R, a krwinki z niedoborami tych białek mogą mieć nieprawidłową morfologię (17, 49).

Znajdująca się w makrokompleksie cząsteczka CD47 jest białkiem powierzchniowym z nadrodziny immunoglobulin, które występuje na prawie wszystkich komórkach w organizmie (53). W ludzkich erytrocytach większość CD47 jest przyłączona do cytoszkieletu za pośrednictwem białka 4.2. Cząsteczkę CD47 uważa się za białko, którego obecność na powierzchni komórek chroni je przed fagocytozą przez makrofagi, dając sygnał „nie zjadaj mnie”. Publikacje oparte na doświadczeniach z liniami komórkowymi i zwierzętami dowodziły, że podczas starzenia się komórek, w tym krwinek czerwonych, spada ekspresja cząsteczki CD47 i dlatego są eliminowane. Sugerowano, że *ex vivo*, podczas przechowywania i starzenia KKCz, CD47 ulega podobnym zmianom konformacyjnym wywołanym przez stres oksydacyjny, co może przyspieszać hemolizę pozanaczyniową przetoczonych krwinek czerwonych (53). Jednak nowe doniesienia dotyczące znaczenia CD47 u ludzi wskazują na bardziej złożoną, regulacyjną rolę tego białka, które może przyspieszać lub hamować fagocytozę. W mechanizmie przełączania biorą udział białka regulatorowe SIRP- α (ang. *signal regulatory protein α*) i trombospondyna-1 – TSP-1 (53, 54).

Badania własne dotyczące wybranych cząsteczek CD, czyli cząsteczek adhezyjnych i/lub inhibitorów układu dopełniacza: CD44, CD47, CD55, CD58, CD59, CD235a oraz wybranych antygenów krwinek czerwonych wykazały, że w końcowym okresie przechowywania, czyli w 42. dniu, cząsteczki powierzchniowe integralnie związane z błoną komórkową miały inną ekspresję niż w pierwszych dniach przechowywania (55, 56). Zjawisko to nie dotyczyło cząsteczek związanych z kotwicą GPI, czyli CD55 i CD59. Największe różnice zależały od obecności, a następnie rozpadu leukocytów. Leukoredukcja, czyli filtrowanie

i stosowanie ubogoleukocytarnych KKCz, mogłoby być korzystne dla jakości krwinek czerwonych.

Dalsze badania jakości krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji zapewne będą przeprowadzane. Na razie trudno wyciągać jednoznaczne wnioski dotyczące bezpieczeństwa i efektywności stosowania sześciotygodniowego okresu przechowywania KKCz. Na pewno okres ten umożliwi zabezpieczenie potrzeb pacjentów

i skracanie tego okresu byłoby niebezpieczne, gdyż powodowałoby niedobór krwi. Wydaje się konieczne zwrócenie uwagi na niektóre grupy chorych, np. w kardiologii i neurologii, tak jak to się dzieje w perinatologii i neonatologii oraz prowadzenie badań nad coraz lepszymi płynami do przechowywania KKCz oraz poszukiwanie markerów „starzenia”, które pozwoliłyby sprawować lepszą niż dotąd kontrolę ich jakości.

PIŚMIENNICTWO

1. Łętowska M (red.): Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. MZ, IHIT, NCK, Warszawa 2014: 175-320.
2. Korsak J, Łętowska M (red.): Transfuzjologia kliniczna. α -medica press, Białsko-Biała 2009.
3. Klein HG, Anstee DJ: Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester UK 2014: 22-52, 611-659.
4. Zimirin AB, Hess JR: Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. Vox Sang 2009; 96: 93-103.
5. Pavenski K, Saldenberg E, Lovoie M et al.: Red blood cell storage lesions and related transfusion issues: a Canadian blood services research and development symposium. Transfusion Med Rev 2012; 26: 68-84.
6. Dumont LJ, Baker S, Dumont DF et al.: Exploratory *in vitro* study of red blood cell storage containers formulated with an alternative plasticizer. Transfusion 2012; 52: 1439-1445.
7. Alexander KP, Chen AY, Wang TY et al.: Transfusion practice and outcomes in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Am Heart J 2008; 155: 1047-1053.
8. Steiner ME, Assmann SF, Levy JH et al.: Addressing the question of the effect of RBC storage on clinical outcomes: the red cell storage duration study. Transfus Apher Sci 2010; 43: 107-116.
9. Timmouth A, Fergusson D, Yee ICh, Hebert PC: Clinical consequences of red cell storage in the critically ill. Transfusion 2006; 46: 2014-2027.
10. Vamvakas EC, Carven JH: Length of storage of transfused red cells and postoperative morbidity in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. Transfusion 2002; 40: 101-109.
11. Corwin HL: Blood transfusion. First, do not harm! Chest 1999; 116: 1149-1150.
12. Raat NJH, Berends F, Verhoeven J et al.: The age of stored red blood cell concentrates at the time of transfusion. Transfus Med 2005; 15: 419-423.
13. Singla I, Zahid M, Good CHB et al.: Impact of blood transfusions in patients presenting with anemia and suspected acute coronary syndrome. Am J Cardiol 2007; 99: 1119-1121.
14. Robinson SD, Janssen Ch, Fretz EB et al.: Red blood cell storage duration and mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Am Heart J 2010; 159: 876-881.
15. Hamasaki N, Yamamoto M: Red blood cell function and blood storage. Vox Sang 2000; 79: 191-197.
16. Annis AM, Sparrow RL: Storage duration and white blood cell content of red blood cell (RBC) products increases adhesion of stored RBCs to endothelium under flow conditions. Transfusion 2006; 46: 1561-1567.
17. De Rosa MC, Carelli Alinovi C, Gattieri A et al.: The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron. Gene 2007; 398: 162-171.
18. Hod EA, Zhang N, Sokol SA et al.: Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. Blood 2010; 115: 4284-4292.
19. Yetik-Anacak G, Catravas JD: Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. Vasc Pharmacol 2006; 45: 268-276.
20. Bilgin YM, van de Watering LMG, Eijisman L et al.: Is increased mortality associated with post-operative infections after leukocytes containing red blood cell transfusions in cardiac surgery? An extended analysis. Transfusion Med 2007; 17: 304-311.
21. Vamvakas EC, Carven JH: Transfusion and postoperative pneumonia in coronary artery bypass graft surgery: effect of the length of storage of transfused red cells. Transfusion 2002; 39: 701-710.
22. Brecher ME, Hay SN: Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 195-204.
23. Sparrow RL: Red blood cell storage and transfusion-related immunomodulation. Blood Transfus 2010; S3: 26-30.
24. Benjamin RJ: Evidence-based transfusion: young versus old blood as a case study. ISBT Science Series 2009; 4: 323-328.
25. Hebert PC, Chin-Yee I, Fergusson D et al.: A pilot trial evaluating the clinical effects of prolonged storage of red cells. Anesth Analg 2005; 100: 1433-1438.
26. Kiraly LN, Underwood S, Differding JA et al.: Transfusion of aged packed red blood cells results in decreased tissue oxygenation in critically injured trauma patients. J Trauma 2009; 67: 29-32.
27. Klein HG: How safe is blood, really? Biologicals 2010; 38: 100-104.
28. van de Watering LMG: Clinical effects of transfusing older red cell concentrates: an updated overview. ISBT Science Series 2012; 7: 235-237.
29. van de Watering L: Red cell storage and prognosis. Vox Sang 2011; 100: 36-45.
30. Relevy H, Koshkaryev A, Manny N et al.: Blood banking-induced alterations of red blood cell flow properties. Transfusion 2008; 48: 136-146.
31. Aubron C, Nichol A, Cooper DJ et al.: Age of red blood cells and transfusion in critically ill patients. Ann Intensive Care 2013; 3: 2-11.
32. Karger R, Lukow Ch, Kretschmer V: Deformability of red blood cells and correlation with ATP content during storage as leukocyte-depleted whole blood. Transfus Med Hemother 2012; 39: 277-282.
33. Hess JR: Measures of stored red blood cell quality. Vox Sang 2014; 107: 1-9.
34. Chaudhary R, Katharia R: Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage. Blood Transfus 2012; 10: 59-62.
35. Rifkind JM, Nagababu E: Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. Antioxid Redox Signal 2013; 18: 2274-2283.
36. Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT: Storage lesion: role of red blood cell breakdown. Transfusion 2011; 51: 844-851.
37. Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A et al.: Evolution of adverse changes in stored RBCs. PNAS 2007; 104: 17063-17068.
38. Liu Ch, Liu X, Janes J et al.: Mechanism of faster NO scavenging by older stored red blood cells. Redox Biol 2014; 2: 211-219.
39. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE et al.: RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. Transfusion 2008; 48: 1943-1953.
40. Lutz HU, Bogdanova A: Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. Frontiers in Physiology 2013; 4: 1-15.
41. Arashiki N, Kimata N, Manno S et al.: Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. Biochemistry 2013; 52: 5760-5769.
42. Dinkla S, Novotny VMJ, Joosten I et al.: Storage-induced changes in erythrocyte membrane proteins promote recognition by autoantibodies. PLoS One 2012; 7: 1-9.
43. Bratosin D, Leszczynski S, Sartiaux C et al.: Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion: flow cytometric evaluation of stored erythrocytes. Comm Clin Cytometry 2001; 46: 351-356.
44. Mangalmurti NS, Chatterjee S, Cheng G et al.: Advanced glycation end products on stored red blood cells increase endothelial reactive oxygen species generation through interaction with receptor for advanced glycation end products. Transfusion 2010; 50: 2353-2361.
45. Annis AM, Sparrow RL: Variable adhesion of different red blood cell products to activated vascular endothelium under flow conditions. Am J Hematol 2007; 82: 439-445.
46. Silliman CC, Moore EE, Kelher MR et al.: Identification of lipids that accumulate during the routine storage of prestorage leukoreduced red blood cells and cause acute lung injury. Transfusion 2011; 51: 2549-2554.
47. Carton J-P: Blood groups: genetics and physiology. ISBT Science Series 2010; 5: 27-45.
48. Sparrow RL, Healey G, Patton KA et al.: Red blood cell age determines the impact of storage and leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycoprotein A and the release of annexin V. Transfus Apher Sci 2006; 34: 15-23.
49. Daniels G: Function of red cell surface protein. Vox Sang 2007; 93: 331-340.
50. Bruce LJ, Beckman R, Ribeiro ML et al.: A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. Blood 2003; 101: 4180-4188.
51. de Isla NG, Riquelme BD, Rasia RJ et al.: Quantification of glycoprotein A and glycoprotein B on normal human RBCs by flow cytometry. Transfusion 2003; 43: 1145-1152.
52. Anstee DJ: The functional importance of blood group-active molecules in human red blood cells. Vox Sang 2011; 100: 140-149.
53. Oldenborg PA: CD47: a cell surface glycoprotein which regulates multiple functions of hematopoietic cells in health and disease. ISRN Hematology 2013: 614-619.
54. van Bruggen R: CD47 functions as a removal marker on aged erythrocytes. ISBT Science Series 2013; 8: 153-156.
55. Gmerek K, Fabijanska-Mitek J, Loniewska-Lwowska A: Impact of red blood cell storage under the blond bank conditions on their reactivity with autoantibodies. Centr Eur J Immunol 2012; 37: 243-246.
56. Gmerek K, Stachurska A, Fabijanska-Mitek J: Expression levels of CD47 on red blood cells during their storage in blood bank. Centr Eur J Immunol 2013; 38: 187-189.