

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)**Acta Haematologica Polonica**journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem**Praca poglądowa/Review**

Zastosowanie cytometrii przepływowej oraz analizy proteomicznej w ocenie erytrocytarnych białek błonowych podczas przechowywania koncentratów krwinek czerwonych



The use of flow cytometry and proteomic analysis in the evaluation of erythrocyte membrane proteins during storage of red blood cell concentrates

Jadwiga Fabijańska-Mitek*, Katarzyna Gmerek,
Adrianna Łoniewska-Lwowska

Zakład Immunoematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Kierownik: dr hab. n. med. Jadwiga Fabijańska-Mitek, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 02.07.2013

Dostępne online: 19.07.2013

Słowa kluczowe:

- koncentrat krwinek czerwonych
- ubogoleukocytarny koncentrat krwinek czerwonych
- cytometria przepływowa
- proteomika
- spektrometria mas

Keywords:

- Red blood cell concentrates
- Leucodepleted red blood cells
- Flow cytometry
- Proteomics
- Mass spectrometry

ABSTRACT

For over 100 years the erythrocyte cell membrane attracted interest of transfusiologists mainly due to the antigens localized on their surface and associated risks of patient alloimmunisation and therefore the need of serological selection of donor's and recipient's blood. Presently it is known that RBC antigens and other membrane proteins play important transport and protective functions, and are involved in adhesion, maintenance of cell shape and in the process of aging and phagocytosis. Since the available results of retrospective clinical observations suggest an adverse effect of transfusion on selected groups of patients, it is important to undertake studies on the changes taking place within the cell membrane of erythrocytes stored in blood banks. Flow cytometric analysis of stored leucodepleted or non-leucodepleted erythrocyte concentrates, revealed significant changes in the level of expression of many RBC surface molecules: CD44, CD47, CD55, CD58, CD59, CD235a (GPA). In parallel, a significant development of proteomic analysis of stored RBCs is observed. Stored RBCs offer less variability of biological material, caused by drugs, illnesses, etc. when compared with clinical proteomics studies; however, the complexity of the methodology and the lack of uniform and comparable procedures may cause misinterpretation and even create artifacts. Still, modern research methods offer hope for the elaboration of aging biomarkers of stored RBCs as well as for raising the level of transfusion medicine quality.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: CMKP, Zakład Immunoematologii, ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa, Polska.

Adres email: immunoematologia@cmkp.edu.pl (J. Fabijańska-Mitek).

Przechowywanie koncentratów krwinek czerwonych (KKCz) w bankach krwi podlega ściśle określonym rygorom gwarantującym największą skuteczność i bezpieczeństwo transfuzji. Procedury preparatyki, stosowane pojemniki, płyny konserwujące i wzbogacające są w różnych krajach podobne i maksymalny termin ważności tego składnika krwi wynosi 42 dni. Zgodnie z wymogami FDA (*Food and Drug Administration*), po 24 godzinach od przetoczenia 75% krwinek w końcowym okresie przechowywania musi być obecnych w krążeniu biorcy [1]. Tak określoną jakość sprawdza się, podając ochotnikom autologiczne KKCz znakowane radioaktywnie lub allogeniczne KKCz różniące się wybranym antygenem. W drugim przypadku dobrym narzędziem oceny jest cytometr przepływowy umożliwiający wykrycie małej populacji krwinek czerwonych dawcy w próbce krwi biorcy. Kontrole jakości pokazują, że odzysk przechowywanych erytrocytów w ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych (UKKCz) zazwyczaj wynosi ok. 84%. Jednocześnie stwierdzano indywidualne różnice między wolontariuszami wpływające na otrzymywane wyniki.

Od wielu lat znane i cytowane są opinie o zmianach biochemicznych zachodzących w przechowywanych erytrocytach. Polegają one na spadku stężenia 2,3DPG i ATP, czyli wysokoenergetycznych metabolitów, które wpływają na powinowactwo hemoglobiny do tlenu oraz na elastyczność krwinek czerwonych [2]. Dodatkowo sugeruje się upośledzenie transportu tlenu azotu, odpowiedzialnego za rozszerzenie naczyń włosowatych w niedotlenionych tkankach. Znane są zaburzenia elektrolitowe, w tym „ucieczka” jonów potasu z wnętrza komórek na zewnątrz. Zmiany te mają w znacznym stopniu wracać do normy, gdy krwinki czerwone znajdują się w naturalnym środowisku krwi biorcy.

Badania na zwierzętach wykazały, że pozanaczyniowe niszczenie starych krwinek dostarcza dużej ilości niezwiązanego z transferyną żelaza do układu siateczkowo-śródbłonkowego, co wzbudza wytwarzanie cytokin i może prowadzić do uogólnionego procesu zapalnego [3]. Cytokiny mogą też pochodzić z nieusunętych leukocytów, a płytki krwi po rozpadzie dostarczają prokoagulacyjnych ziarnistości. Warto zwrócić uwagę, że przetwarzając 4 jednostki „starego” KKCz, z których 25% może hemolizować, dopuszcza się możliwość całkowitego rozpadu jednej jednostki krwinek czerwonych. Obecność uwalnianego żelaza indukuje wzrost bakterii i może sprzyjać ryzyku zakażeń w przypadku stosowania długo przechowywanych KKCz [4]. Zakażenia zimnolubnymi bakteriami *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* sp. są rzadkie, ale gdy bakterie dzielą się tylko raz na dzień, to po 27 dniach z jednej bakterii powstaje 10^8 organizmów i chociaż tylko jedna na 2000 jednostek KKCz zawiera bakterie ze skóry lub krwi dawcy, a jedna na 5 000 000 jednostek KKCz daje objawy zakażenia u chorego, to powikłanie takie jest niebezpieczne, a jego ryzyko wzrasta z wydłużaniem czasu przechowywania.

Jeżeli istnieje potencjalnie większe ryzyko powikłań po przetoczeniu krwinek „starych” niż „świeżych”, to powstaje pytanie: czy czas przechowywania KKCz powinno się skrócić? Jeśli odpowiedź będzie brzmieć „tak”, to ograniczy się zmiany reologiczne i spadek zdolności do utleniania tkanek, zmniejszy się ilość uwalnianych cząsteczek bioaktywnych oraz ograniczy możliwość zakażenia. Jednak odpowiedź „nie”

wyduje się koniecznością. W większości banków krwi wykorzystuje się 99% jednostek KKCz w terminie do 42 dni, a do 21 dni tylko 30% [5]. Strata 2/3 donacji, przy nieudowodnionym znaczeniu zmian w KKCz i jednoczesnych zdolnościach naprawczych organizmu biorcy, uniemożliwiłaby dostęp do odpowiednich dla ratowania życia objętości krwi. W tej sytuacji warto rozważyć szczególne podejście do transfuzji krwi u pewnych grup dorosłych chorych i ewentualne dostosować dla nich przepisy, podobnie jak w praktyce leczenia krwią płodów, noworodków i niemowląt.

W spoczynku większość tkanek pobiera 25–35% dostępnego tlenu, ale serce, nerki i mózg 55–70% [5]. Chorzy kliniki neurologicznych, nefrologicznych i kardiologicznych są potencjalnie bardziej narażeni na skutki niedokrwistości i hemolizy. Pacjenci z chorobą niedokrwinną serca, w tym z ostrymi zespołami wieńcowymi, byli dotychczas częstym obiektem klinicznych badań retrospektywnych. Oprócz niedotlenienia, groźne w skutkach są dla nich zaburzenia krzepnięcia związane z aktywacją dopełniacza, uwalnianiem ziarnistości płytek krwi i cytokin zapalnych oraz nadmiar jonów potasu bezpośrednio wpływających na czynność mięśnia sercowego. Wyniki badań wykazały większą śmiertelność i dłuższą hospitalizację pacjentów leczonych krwią niż nieleczonych, w tym głównie chorych, którym przetaczano „stare”, niepozabawione leukocytów KKCz, w stosunku do chorych leczonych „świeżymi” jednostkami filtrowanymi, czyli ubogoleukocytarnymi [6–12]. Często odnotowywano niewydolność nerek, zakażenia, w tym sepsę, oraz nieimmunologiczną ostrą poprzetoczeniową niewydolność oddechową (*transfusion related acute lung injury*; TRALI), np. z powodu uwalniania lipidów aktywujących neutrofile. Między innymi, kliniczne badania kanadyjskie z 2010 roku objęły 32 580 chorych z ostrym zespołem wieńcowym i wykazały, że 909 (2,8%) z nich otrzymało co najmniej jedną jednostkę UKKCz (1–21) w ciągu 10 dni po zabiegu [13]. Oceniano przeżycie w ciągu 30 dni i statystycznie wykazano, że transfuzja przechowywanych KKCz była dodatkowym czynnikiem ryzyka dla tych chorych. Inne badania dotyczyły 4933 pacjentów, którzy otrzymali w sumie 21 435 jednostek UKKCz, najczęściej 3, średnio przechowywane przez 17 dni. Ponieważ 535 pacjentów zmarło, oceniono zależność czasu przechowywania KKCz i śmierci w szpitalu [12]. Statystycznie istotnie większa śmiertelność zależała od objętości przetoczonej krwi oraz od czasu przechowywania głównie powyżej 28 dni. Uznano, że należy rozważyć zasadność dalszego stosowania KKCz w końcowym okresie ważności u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego, gdyż skutek transfuzji może być odwrotny od zamierzonego. Pod koniec 2011 roku przeprowadzono analizę 103 publikacji dotyczących niekorzystnych skutków transfuzji i stwierdzono, że ciągle brak jednoznacznej opinii na ten temat i tym samym konieczna jest współpraca międzynarodowa z zaprojektowaniem badań prospektywnych uwzględniających ocenę chorych oraz preparatykę krwi, roztwory, plastyfikatory itp. [5].

Z drugiej strony, dostępność nowych metod laboratoryjnych skłania do badań nad przechowywanymi krwinkami czerwonymi. Od 100 lat błona komórkowa erytrocytu wzbudza zainteresowanie transfuzjologów ze względu na zlokalizowane na jej powierzchni antygeny, związane z nimi ryzyko alloimmunizacji oraz konieczność serologicznego

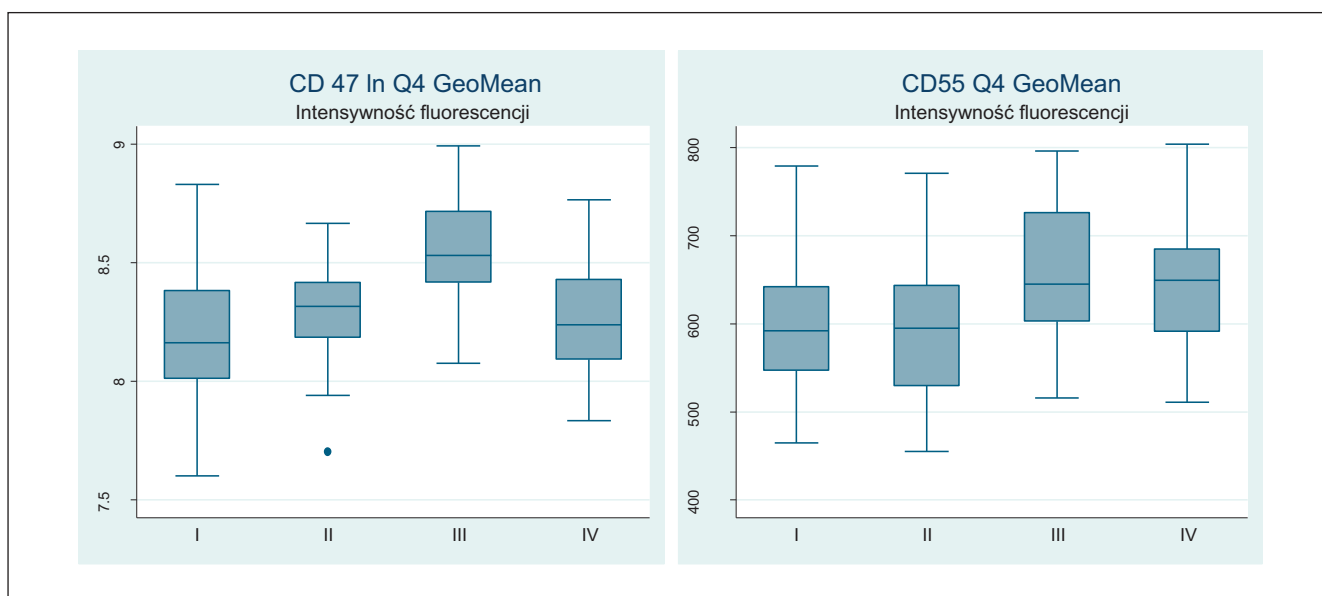
Tabela I – Badane cząsteczki CD i ich główne funkcje
Table I – Tested CD molecules and their main functions

CD44	adhezja
CD47	udział w makrokompleksie Rh, adhezja, ochrona przed fagocytozą
CD55	inhibitor dopełniacza (DAF; Decay Accelerating Factor)
CD58	adhezja
CD59	inhibitor dopełniacza (MIRL I; Membrane Inhibitor of Reactive Lysis I)
CD235a (GPA)	udział w starzeniu się erytrocytów, inhibitor dopełniacza MIRL II

doboru dawcy i biorcy krwi. Obecnie wiadomo, że nośniki antygenów grupowych są białkami stanowiącymi integralną część błony komórkowej i pełnią rolę transporterów oraz kanałów (układy: Rh, RhAG, Diego), cząsteczek adhezyjnych i receptorów (układy: LW, Lutheran, Indian, Duffy, MNS) i są inhibitorami układu dopełniacza (układy: Dombrock, Cromer) [13]. Część tych struktur tworzy makrokompleks odpowiedzialny za najważniejsze funkcje życiowe krwinek czerwonych, związane z wymianą gazową oraz za utrzymanie kształtu, poprzez oddziaływanie z białkami cytoszkieletu, a także za czas przeżycia zależny od zmian w błonie komórkowej [14]. Metody serologiczne wykazały pewne zmiany w ekspresji antygenów grupowych oraz tworzenie neoantygenów starzenia [15, 16]. Dostępność przeciwciał monoklonalnych skierowanych do innych cząsteczek powierzchniowych oraz możliwość ich oceny czułą, swoistą i obiektywną metodą cytometrii przepływowej skłoniła niektórych autorów, w tym nas, do podjęcia badań nad krwinkami czerwonymi przeznaczonymi do transfuzji. Dotychczas najwięcej publikacji poświęcono cząsteczce CD47, transbłonowej glikoproteinie o własnościach adhezyjnych. Przypisuje się jej znaczenie ochronne przed niszczeniem własnych

komórek [17–20]. Wiązanie CD47 z SIRP α (signal regulatory protein) na makrofagach daje sygnał hamujący erytrofagocytozę. Opisano spadek ekspresji CD47 o 30% na krwinkach „starych” w stosunku do „młodych”, stwierdzono krótki czas przeżycia przetoczonych erytrocytów CD47_{null} oraz wystąpienie niedokrwistości autoimmunohemolitycznej (NAIH) u takich osobników. Badania te prowadzono na modelach mysich i można mieć wątpliwości, czy te same mechanizmy występują u ludzi. Dotychczas nie stwierdzono spadku CD47 oraz cząsteczek CD35 i CD59 u chorych na NAIH [21]. Nie obserwowano zwiększonego oddziaływania krwinek Rh_{null} z monocytami krwi obwodowej mimo skróconego czasu przeżycia i obniżonej ekspresji CD47 [22].

Wybrane przez nas do badań cząsteczki i ich funkcje przedstawiono w tabeli I. Zmiany ich ekspresji mogłyby mieć związek z opisywanymi i wyżej przedstawionymi niekorzystnymi skutkami przetaczania długo przechowywanych KKCz. Dotychczas przeprowadzono analizy statystyczne uzyskanych wyników średniego nasilenia fluorescencji dla każdej cząsteczki oraz liczby znakujących się komórek w KKCz „świeżych” (2–3 dni od pobrania) i „starych” (42 dni), przechowywanych z leukocytami oraz ubogoleukocytarnych. Uzyskane wyniki wykazały, że ekspresja większości cząsteczek uległa istotnym statystycznie zmianom podczas przechowywania (dane niepublikowane). Rycina 1 przedstawia te zmiany na przykładzie cząsteczek CD47 i CD55. Największe różnice przy $p < 0,0001$ odnotowano dla CD47 między „świeżymi” UKKCz (grupa II) i „starymi” KKCz, (grupa III), ale w przypadku cząsteczki CD55 wpływ na wzrost jej ekspresji miała tylko obecność leukocytów, niezależnie od czasu przechowywania (grupy I i II vs III i IV). Wzrostowi średniej ekspresji nie zawsze towarzyszyła większa liczba silnie wyznakowanych erytrocytów – w przypadku CD47 najwięcej było ich w „świeżych” UKKCz. Zależnie od czasu i sposobu przechowywania obserwowano też



Ryc. 1 – Porównanie ekspresji cząsteczek CD47 i CD55 na krwinkach czerwonych w UKKCz „starych” (I), UKKCz „świeżych” (II), KKCz „starych,” (III) i KKCz „świeżych” (IV) (własne wyniki)

Fig. 1 – Comparison of CD47 and CD55 expression on RBCs in leucodepleted “old” (I) and “fresh” (II), non-leucodepleted “old” (III) and “fresh” (IV) units (own results)

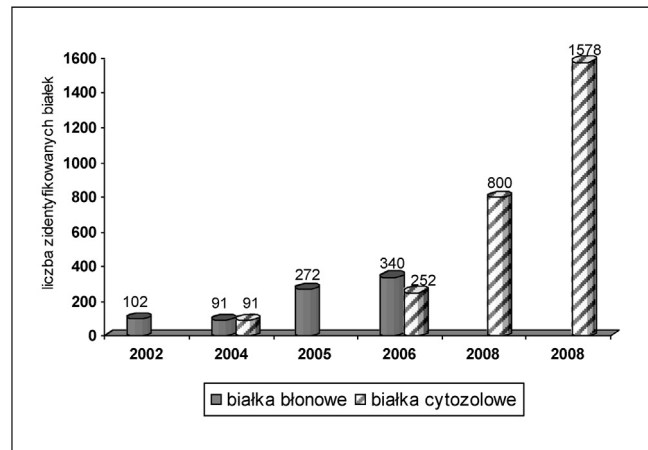
różne i zmieniające się subpopulacje krwinek czerwonych. Po zakończeniu badań w dodatkowych punktach czasowych ich wyniki będą przedstawione w publikacji oryginalnej.

Dotychczasowe obserwacje własne oraz doniesienia innych autorów wykazały, że zasadne jest poszukiwanie zmian w obrębie błon komórkowych krwinek czerwonych podczas ich przechowywania w bankach krwi. Dalszym krokiem może być szczegółowe ich zdefiniowanie poprzez analizę proteomiczną.

Termin proteomika wprowadzono w połowie lat 90. dla określenia kompleksowego procesu poznawania wszystkich białek w liniach komórkowych, tkankach, płynach ustrojowych lub całych organizmach. Celem proteomiki jest analiza i charakterystyka proteomu, a nie jego pojedynczych składników, co łącznie z genomiką, metabolomiką i innymi „-omikami” może przyczynić się do zrozumienia funkcjonowania organizmów. Oprócz proteomicznych badań podstawowych rozwija się proteomika kliniczna, której celem jest poszukiwanie różnic w proteomie osób zdrowych i chorych oraz wskazanie biomarkerów konkretnych chorób. Często stosowanym narzędziem do badań proteomicznych jest spektrometria mas (MS), za pomocą której przeprowadza się analizę złożonych mieszanin białkowych oraz identyfikację i ocenę ilości poszczególnych jej składników. W drodze enzymatycznego trawienia uzyskuje się peptydy, poddaje się je jonizacji, rozdzieleniu w polu magnetycznym lub elektrycznym i ocenia za pomocą pomiaru parametru, który wyraża stosunek masy peptydu do jego ładunku. Wartości uzyskane w postaci tzw. widm masowych są analizowane za pomocą oprogramowania wykorzystującego specjalistyczne algorytmy i prowadzą do identyfikacji białek zawartych w próbce. Współczesne spektrometry masowe zbudowane są z trzech części: jonizatora, analizatora masy i detektora, połączonych z urządzeniem (np. HPLC; *High Pressure Liquid Chromatography*, wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa) do wstępnego frakcjonowania analizowanej próbki. W zależności od budowy i zasady działania istnieją różne techniki frakcjonowania, jonizacji oraz analizowania mas. Obecnie najczęściej stosuje się dwie techniki jonizacji: tzw. MALDI czyli desorpcja laserowa z udziałem matrycy (*Matrix assisted laser desorption/ionization*) oraz ESI (*electrospray ionization*) – elektrorozpylanie.

Pierwsze wyniki analiz proteomicznych, dotyczące krwinek czerwonych z zastosowaniem technik MS, opublikowano w 2002 roku. Low i wsp. skupili uwagę na analizie proteomu błon erytrocytarnych i zidentyfikowali 102 białka [23]. W ciągu kolejnych lat identyfikowano dalsze białka erytrocytarne, a ich liczba rosła w szybkim tempie (Ryc. 2). Do tej pory za pomocą MS zidentyfikowano 1578 białek cytozoolowych [24] oraz 314 białek błonowych erytrocytów [25]. Postęp osiągnięto głównie dzięki zastosowaniu różnych metod jonizacji oraz różnych analizatorów mas, a także dzięki wykorzystaniu wyrafinowanych metod redukcji ilości białek (np. stosowanie tzw. bibliotek ligandowych) stanowiących główny składnik proteomu i utrudniających analizę pozostałych białek.

W ostatnich latach zaczęto wykorzystywać metody analizy proteomicznej w celu badania zmian proteomów zachodzących w erytrocytach przechowywanych w warunkach banków krwi. Koncentrowano się na zmianach jakościowych



Ryc. 2 – Postęp w analizie proteomu krwinek czerwonych
Fig. 2 – Progress in the analysis of the red blood cells proteome

i ilościowych białek budujących błonę komórkową i cytoskielet, na procesach degradacyjnych prowadzących do uwalniania białek erytrocytarnych do środowiska zewnętrznego oraz powstawania mikropęcherzyków. Annis i wsp. przeprowadzili analizę proteomiczną białek obecnych w roztworach pochodzących z jednostek KKCz i UKKCz [26]. Autorzy podkreślili udział leukocytów i płytek krwi w degradacji erytrocytów i uwalnianiu białek. D'Amici i wsp. analizowali zmiany oksydacyjne i proteolityczne w przechowywanych jednostkach krwi [27]. Przy wykorzystaniu metody jonizacji w postaci elektrorozpylania analizowano białka pochodzące z erytrocytów przechowywanych z leukocytami, które stanowią źródło enzymów proteolitycznych, w warunkach tlenowych lub beztlenowych oraz w obecności inhibitorów białkowych. Stwierdzono, że zmiany zachodzące w obrębie białek cytoskieletu były związane w większym stopniu z procesem ich utleniania niż z proteolizą.

Fizjologiczne zjawisko uwalniania mikropęcherzyków w trakcie zmian zachodzących w starzejących się erytrocytach in vivo skłoniło naukowców do analizy proteomicznej roztworów obecnych w przechowywanych jednostkach KKCz i oceny składu białkowego uwolnionych mikropęcherzyków. Rubin i wsp. zaobserwowali istotny wzrost powstawania mikropęcherzyków (MP) wraz z długością przechowywania krwi, a analiza proteomiczna wykazała obecność znaczącej ilości stomatyny, fosfatydoseryny, a także antygenów grupowych z układu Rh [28]. Grupa kierowana przez Zolla skoncentrowała uwagę na zmianach ilościowych i jakościowych białek błon przechowywanych erytrocytów, w zależności od obecności lub braku tlenu. Wśród frakcji błonowej wykryto białka cytoplazmatyczne, np. globiny oraz katalazy, i peroksyredoksyny 2 (PRX-2), czyli enzymy odpowiedzialne za obronę komórki przed atakiem wolnych rodników. Wykazano przyrost ilości wyżej wspomnianych białek cytozoolowych w trakcie przechowywania krwi w warunkach tlenowych w przeciwieństwie do warunków beztlenowych. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano PRX-2 jako biomarker oksydacyjnego uszkodzenia błon erytrocytów w trakcie ich starzenia się [29].

Mimo że badania krwinek czerwonych dla celów transfuzjologicznych wydają się mniej obciążone zmiennością materiału biologicznego w stosunku do innych badań proteomiki klinicznej (wpływ leków, przebyte choroby itp.), to złożoność procesu laboratoryjnego oraz brak jednolitych, porównywalnych procedur może być przyczyną nieprawidłowych interpretacji i tworzenia artefaktów [30]. Zanim zastosuje się MS i uzyska bioinformatyczny wynik badania, niezwykle ważny jest etap przygotowania próbek materiału. W przypadku proteomu błon erytrocytów jest to izolacja białek. Nasze dotychczasowe doświadczenia wskazują, że dla krwinek czerwonych przechowywanych jako jednostki KKCz lub UKKCz trzeba opracować własne procedury izolacji ich od retikulocytów oraz izolacji białek, gdyż nie można wzorować się na metodach autorów badających proces starzenia się krwinek *in vivo*, czyli izolujących frakcje erytrocytów ze świeżo pobranych próbek krwi. Ten etap wydaje się kluczowy dla analizy proteomicznej i poszukiwania biomarkerów jakości krwinek czerwonych przeznaczonych do transfuzji.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Roback JD, Combs JR, Grossman BJ, Hillyer ChD. Technical Manual – 16-th edition. Bethesda, USA: AABB; 2008.
- [2] Zimrin AB, Hess JR. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox Sang* 2009;96: 93–103.
- [3] D'almeida MS, Jagger J, Duggan M, et al. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. *Transfus Med* 2001;10:291–303.
- [4] 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.
- [5] van de Watering L. Red cell storage and prognosis. *Vox Sang* 2011;100:36–45.
- [6] Ho J, Sibbald WJ, Chin-Yee IH. Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe? (scientific reviews) *Crit Care Med* 2003;31:S686–S697.
- [7] Rao SV, Jollis JG, Harrington RA, et al. Relationship of blood transfusion and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *JAMA* 2004;292: 1555–1562.
- [8] Singla I, Zahid M, Good CB, et al. Impact of blood transfusions in patients presenting with anemia and suspected acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2007;99:1119–1121.
- [9] Weinberg JA, McGwin Jr G, Griffin LG, et al. Age of transfused blood: an independent predictor of mortality despite universal leukoreduction. *J Trauma* 2008;65: 279–284.
- [10] Yang X, Alexander KP, Chen AY, et al. The implications in blood transfusion for patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Results from the CRUSADE National Quality Improvement Initiative. *J Am Col Cardiol* 2005;46:1490–1495.
- [11] Robinson SD, Jansen Ch, Fretz EB, et al. Red cell storage duration and mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2010;159:876–881.
- [12] Eikelboom JW, Cook RJ, Liu Young, Heddle NM. Duration of red cell storage before transfusion and in-hospital mortality. *Am Heart J* 2010;159:737–743.
- [13] Daniels G. Structure and function of red cell surface antigens. *Sci Series* 2006;1:3–8.
- [14] Endeward V, Cartron J-P, Ripoche P, Gros G. RhAG protein of the rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *FASEB J* 2008;22:64–73.
- [15] Garratty G. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? *Transfusion Med* 2008;18:321–334.
- [16] Gmerek K, Fabijańska-Mitek J, Loniewska-Lwowska A. Impact of red blood cell storage under the blood bank conditions on their reactivity with autoantibodies. *CEJI* 2012;37:243–246.
- [17] Sparrow RL, Veale MF, Healey G, Payne KA. Red blood cell (RBC) age at collection and storage influences RBC membrane-associated carbohydrates and lectin binding. *Transfusion* 2007;47:966–968.
- [18] Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia to avoid phagocytosis. *Cell* 2009;138: 271–285.
- [19] Sekigami-T, Kaneko Y, Saito Y, et al. Enhanced phagocytosis of CD47-deficient red blood cells by splenic macrophages requires SHPS-1. *Biochem Biophys Res Com* 2006;343:1197–1200.
- [20] Oldenburg P-A, Zheleznyak A, Fang Y-F, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288:2051–2054.
- [21] Barros MMO, Yamamoto M, Figueiredo MS, et al. Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein- α , β on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 2009;49:154–160.
- [22] Arndt PA, Garratty G. Rh_{null} red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes. *Brit J Hematol* 2004;125: 412–414.
- [23] Low TY, Seow TK, Chung MCM. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrixassisted laser

- desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2002;2:1229-1239.
- [24] Roux-Dalvai F, Gonzalez de Peredo A, Simó C, et al. Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:2254-2269.
- [25] Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, et al. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 2006;108:791-801.
- [26] Annis AM, Glenister KM, Killian JJ, et al. Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products. *Transfusion* 2005;45:1426-1433.
- [27] D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res* 2007;6:3242-3255.
- [28] Rubin O, Crettaz D, Canellini G, et al. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang* 2008;95:288-297.
- [29] Rinalducci S, D'Amici GM, Blasi B, et al. Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. *Transfusion* 2011;51:1439-1449.
- [30] Silberring J. Problemy proteomiki klinicznej – trendy, niebezpieczeństwa i problemy. *Postępy Biologii Komórki* 2009;36(S25):111-115.