

Metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w koncentracie krwinek czerwonych i krwi pełnej

Pathogen inactivation methods for red blood cells and whole blood

Elżbieta Lachert¹, Jolanta Kubis¹, Jolanta Antoniewicz-Papis¹, Michał Bubiński²,
 Magdalena Łętowska¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi

Streszczenie

Począwszy od końca lat 90. ubiegłego stulecia metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi przeznaczonych do przetoczenia zaczęto wdrażać do rutynowej pracy placówek służby krwi w wielu krajach. Obecnie rutynowo są stosowane trzy metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi: system Theraflex MB-Plasma (dla osocza) z zastosowaniem błękitu metylenowego, system Intercept [dla osocza i koncentratu krwinek płytkowych (KKP)] z zastosowaniem chlorowodoru amotosalenu oraz system Mirasol (dla osocza i KKP), w którym wykorzystano ryboflawinę.

Dotychczas opracowano kilka metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w koncentracie krwinek czerwonych (KKCz) oraz metodę inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej. Jednakże ze względu na niezakończone badania kliniczne żadna z nich nie została wdrożona do rutynowego stosowania.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej i KCz.

Słowa kluczowe: inaktywacja czynników chorobotwórczych, koncentrat krwinek czerwonych, krew pełna

J. Transf. Med. 2018; 11: 63–71

Summary

The late 1990s witnessed the beginnings of pathogen inactivation methods implemented into the routine work of blood transfusion service of many countries with the intention of preparing safe blood components dedicated for transfusion. Currently, there are three registered methods of pathogen inactivation: Theraflex MB-Plasma system using methylene blue (for pathogen inactivation in plasma), Intercept system using amotosalen (for pathogen inactivation in plasma and platelet concentrate) and the Mirasol[®]PRT system which is based on riboflavin (for pathogen inactivation in plasma and platelet concentrate).

Up to date, several methods have been developed for pathogen inactivation in red blood cells and whole blood. None of them however have yet been implemented into routine use, due to

unfinished clinical trials. The aim of this study was to present the current state of knowledge as regards pathogen inactivation in whole blood and red blood cells.

Key words: pathogen inactivation, red blood cells, whole blood

J. Transf. Med. 2018; 11: 63–71

Wstęp

Począwszy od końca lat 90. ubiegłego stulecia metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi przeznaczonych do przetoczenia zaczęto wdrażać do rutynowej pracy placówek służby krwi w wielu krajach. Na podstawie doświadczeń zdobytych podczas opracowywania metod inaktywacji czynników zakaźnych w procesie frakcjonowania osocza, skoncentrowano się na opracowaniu metod inaktywacji w osoczu przeznaczonym do celów klinicznych. Opracowaną w 1985 roku metodę rozpuszczalnik/detergent (SD), zastosowaną w celu zmniejszenia ryzyka przeniesienia istotnych klinicznie wirusów otoczkowych wraz z przetaczanymi produktami krwiopochodnymi, poddano modyfikacji i od 1991 roku zastosowano także w odniesieniu do osocza przeznaczonego do użytku klinicznego. W tym samym czasie opracowano metodę z błękitem metylenowym, ograniczającą ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych w osoczu [1, 2].

W pierwszej dekadzie XXI wieku wysiłki badawcze zaowocowały zarówno opracowaniem nowych metod inaktywacji w składnikach krwi, jak i ulepszeniem metod dotychczas stosowanych. Firma Macopharma zmodyfikowała metodę inaktywacji

z błękitem metylenowym w osoczu, opracowując system Theraflex MB-Plasma (oznakowanie CE-2000 r.). Chlorowodorek amotosalenu zastosowano w systemie Intercept, na początku opracowanym w celu inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKP (oznakowanie CE-2002 r.), a następnie w osoczu (oznakowanie CE-2006 r.). Z kolei w systemie Mirasol[®]PRT zastosowano ryboflawinę do inaktywacji w KKP (oznakowanie CE—2007 r.) i w osoczu (oznakowanie CE—2008 r.). Wyżej wymienione systemy są stosowane rutynowo w placówkach służby krwi w celu inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w osoczu i KKP. Chociaż opracowano kilka metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKCz oraz metodę inaktywacji w krwi pełnej, to żadna z nich nie została jeszcze wdrożona do rutynowego stosowania. Wprawdzie jakość krwinek czerwonych poddanych inaktywacji oceniono w szczegółowych badaniach *in vitro* (tab. 1), to nadal nie zakończono badań klinicznych. Obecnie, bezpieczeństwo i skuteczność lecznicza koncentratów krwinek czerwonych poddanych inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych są oceniane w trakcie wielośrodkowych badań klinicznych [3–5]. Celem niniejszej pracy było przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej

Tabela 1. Ocena *in vitro* koncentratów krwinek czerwonych

Table 1. In vitro evaluation of red blood cells

Testy podstawowe	Zmiany morfologiczne błony komórkowej	Aktywność metaboliczna	Testy oporności	Elektrolity
Objętość KKCz	Wskaźnik morfologii błony komórkowej — dyskocyty — echinocyty — echinosferocyty — sferocyty	Stężenie glukozy w supernatancie	Oporność osmotyczna	Zawartość potasu
Całkowita zawartość Hb	Ekspresja CD 47 — białko, chroniące komórkę przed fagocytozą przez makrofagi	Stężenie mleczanu w supernatancie, pH, pO ₂ , pCO ₂		Zawartość sodu
Hematokryt	Ekspresja CD 44 — cząsteczka adhezyjna, biorąca udział w procesach migracji	Zawartość 2,3-DPG		
MCV	i oddziaływań międzykomórkowych	Zawartość ATP		
Stopień hemolizy w końcowym okresie przechowywania				

inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej i KKCz

Próby opracowania metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w koncentracji krwinek czerwonych

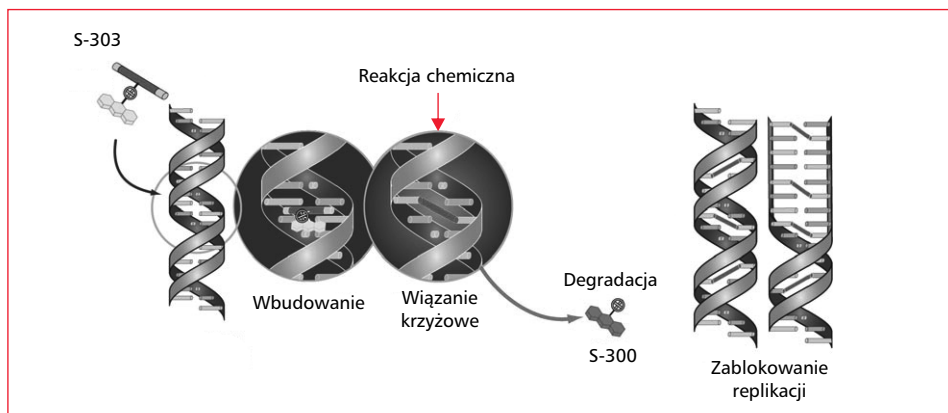
Pierwsze próby opracowania metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKCz i krwi pełnej (KP) rozpoczęto już w latach 90. XX wieku. Były to metody oparte na reakcjach z udziałem światła i fotouczulacza. Jedną z pierwszych grup związków zastosowanych jako fotouczulacze w próbach opracowania metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKCz były porfiryny. Niestety okazało się, że większość porfiryn ma charakter amfifilowy i wykazuje tendencję do gromadzenia się w błonach komórkowych, co powoduje, że związki te inaktywują wyłącznie wirusy otoczkowe. Przykładem są pochodne hematoporfiryny i dihematoporfiryny, które skutecznie inaktywują różne otoczkowe wirusy, podczas gdy w stosunku do bezotoczkowych wirusów są nieaktywne. Benzoporfiryna z kolei jest fotouczulaczem, który wykazuje silne powinowactwo do lipoprotein. Związek ten inaktywuje wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV, *vesicular stomatitis virus*) oraz ludzkiego wirusa upośledzenia odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) zarówno w formie wolnej, jak i związanej, przy ograniczonym uszkodzeniu krwinek czerwonych [6]. Jednakże eksperymentalne badania dotyczące tych związków zostały wstrzymane, ponieważ pojawiły się nowe fotouczulacze o bardziej obiecującej charakterystyce. Holenderscy badacze opracowali między innymi związki o charakterze kationowym, które nazwano *Sylsense compounds*. Stwierdzono ponadto, że jeden z nich może być odpowiedni do inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w czerwonekrwinkowych składnikach krwi. Fotouczulacze te aktywują się pod wpływem światła widzialnego (> 600 nm), skutecznie inaktywują wirusy otoczkowe (włączając HIV, VSV i wirusa biegunki bydła (BVDV, *bovine viral diarrhoea virus*), model dla wirusa zapalenia wątroby typu C oraz wirusa Zachodniego Nilu) oraz bakterie G (+) i bakterie G (-). W trakcie badań jakościowych KKCz poddanych inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych stwierdzono minimalne uszkodzenia krwinek czerwonych. Po pięciu tygodniach ich przechowywania średni stopień hemolizy wynosił niewiele ponad 1%, natomiast wszystkie

pozostałe parametry, włączając stężenie ATP, były porównywalne z parametrami uzyskanymi w KKCz z grupy kontrolnej. W badaniach eksperymentalnych ustalono ponadto, że dodanie dipirydamolu do mieszaniny reakcyjnej powoduje jego łączenie się z krwinkami czerwonymi. Skutkiem tej reakcji jest zablokowanie powstawania reaktywnych form tlenu (ROS, *Reactive Oxygen Species*), co z kolei wpływa na zminimalizowanie uszkodzeń krwinek czerwonych [7].

Błękit metylenowy (barwnik fenotiazynowy) z powodzeniem zastosowany w systemie Theraflex MB Plasma, przeznaczonym do inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w osoczu, nie mógł być zastosowany do opracowania metody inaktywacji w KKP lub KKCz ze względu na duże powinowactwo do łączenia się z białkami i lipoproteinami wchodzącymi w skład błony otoczkowych wirusów oraz kwasów nukleinowych. Ponadto z powodu hydrofilowego charakteru błękit metylenowy nie penetruje łatwo komórek. Z tego względu nie może być stosowany do inaktywacji wewnątrzkomórkowych czynników zakaźnych. Z kolei inny związek fenotiazynowy — błękit 1,9-dwumetylometylenowy wydawał się lepszym fotouczulaczem niż błękit metylenowy, ze względu na hydrofobowy charakter związku, który przechodzi przez błonę komórkową i charakteryzuje się większym powinowactwem do kwasów nukleinowych. Metoda z zastosowaniem tego fotouczulacza inaktywuje zarówno szerokie spektrum wirusów otoczkowych i bezotoczkowych, jak i świdrowca *Trypanosoma cruzi*. Związek ten w mniejszym stopniu niż błękit metylenowy uszkadza krwinki czerwone [7].

Interesującym związkiem z punktu widzenia metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych przeznaczonej dla krwinek czerwonych był hydrofobowy silikon. Związek ten skutecznie inaktywuje tak zwane modelowe wirusy otoczkowe. Wprawdzie metoda nie wpływała w znaczący sposób na jakość krwinek czerwonych, lecz znacząco skrócił czas ich przeżycia spowodował, że nie kontynuowano badań klinicznych [8].

Merocyjanina 540 jest fotouczulaczem testowanym w celu oczyszczania autologicznego szpiku z komórek białaczkowych i chłoniakowych. Wyniki pilotażowych badań wykazały, że fotoinaktywacja z zastosowaniem merocyjaniny 540 inaktywuje szerokie spektrum wirusów. Warunkiem skutecznej inaktywacji jest utrzymanie niskiej wartości hematokrytu (< 15%). Stwierdzono jednak znaczną hemolizę i obniżenia ATP [9].



Rycina 1. Mechanizm reakcji chemicznej z S-303 (dzięki uprzejmości firmy Cerus Corporation; USA)

Figure 1. Mechanism of chemical reaction with S-303 (courtesy of Cerus Corporation; USA)

Metoda inaktywacji oparta na reakcji fotochemicznej z chlorowodorkiem amotosalenu i promieniowaniem UVA (320–400 nm) nie mogła znaleźć zastosowania w przypadku KKCz, ponieważ hemoglobina skutecznie absorbuje promieniowanie UVA.

Chemiczne metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w koncentracie krwinek czerwonych

Ze względu na trudności związane z opracowaniem metody opartej na reakcjach: fotodynamicznej lub fotochemicznej próbowano opracować metody niezależne od energii świetlnej. Największe zainteresowanie wzbudziły dwie metody:

- z zastosowaniem inaktywny (PEN 110), dobrze rozpuszczalnego w wodzie związku kationowego;
- z zastosowaniem alkilującego czynnika S-303 (etylenoimina, azyrydyna) i glutationu.

Metoda z inaktywną — mechanizm działania

Metoda z inaktywną (PEN 110) oparta jest na reakcji, w której reaktywna forma inaktywny tworzy wiązania kowalencyjne w pozycji N7 guaniny łańcucha kwasów nukleinowych czynników zakaźnych. Alkilowanie N7 guaniny powoduje otwarcie struktury pierścienia imidazolowego, prowadząc do uszkodzenia łańcuchów kwasów nukleinowych biologicznych czynników chorobotwórczych. Kolejnymi etapami po inkubacji mieszaniny UKKCz z inaktywną jest proces usuwania inaktywny, a następnie dodanie roztworu wzbogacającego, co umożliwi przechowywanie poddanego inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych UKKCz w temp. 2–6°C do 42 dni [10].

Metoda z S-303 — mechanizm działania

Kolejna metoda oparta jest na reakcji, w której związek S-303 tworzy z kwasami nukleinowymi wiązania poprzeczne poprzez grupę dialkylującą. Po dodaniu do UKKCz, związek S-303 szybko przenika przez otoczki wirusów i wbudowuje się w spiralne regiony kwasów nukleinowych. Stwierdzono jednakże, że S-303 reaguje również z innymi związkami nukleofilowymi krwinek czerwonych, takimi jak fosforany i białka. W celu zminimalizowania tych niespecyficznych reakcji, szczególnie reakcji z białkami, do mieszaniny reakcyjnej jest dodawany glutation — związek występujący w większości komórek i pełniący rolę antyoksydantu. UKKCz inkubowany jest z S-303, glutationem oraz roztworem rozcieńczającym. W trakcie procesu inaktywacji następuje reakcja rozkładu S-303, skutkująca między innymi powstaniem niereaktywnego związku S-300 (ryc. 1). Po zakończonym procesie inaktywacji jest usuwany supernatant, a do zawiesiny krwinek czerwonych jest dodawany roztwór wzbogacający umożliwiający przechowywanie UKKCz w temp. 2–6°C do 35 dni [11].

Skuteczność metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w koncentracie krwinek czerwonych

W badaniach oceniających skuteczność inaktywacji stwierdzono, że zarówno metoda z inaktywną (PEN 110), jak i metoda z S-303 i glutationem skutecznie inaktywują zarówno bakterie G (+) i bakterie G (–) (m.in. *Staphylococcus epidermidis* i *Yersinia enterocolitica*), jak i istotne klinicznie wirusy otoczkowe. Obie metody inaktywują także niektóre wirusy bezotoczkowe.

Metoda z inaktywną jest skuteczna w stosunku do świńskiego parwowirusa (PPV, *porcine parvovirus*) i świńskiego cirkowirusa (PCV, *porcine circovirus*). Potwierdzono także inaktywację świńskiego wirusa wysypki pęcherzykowej (VESV, *vesicular exanthema virus of swine*) modelowego wirusa dla zapalenia wątroby typu E (HEV, *hepatitis E virus*).

Z kolei metoda z S-303 skutecznie inaktywuje ludzki adenowirus 5 (HAdV-5, *human adenovirus 5*) oraz BVDV. Wirus biegunki bydła jest wirusem modelowym dla HCV i innych wirusów z rodziny *Flaviviridae*, należy zatem przypuszczać, że metoda z S-303 może skutecznie inaktywować także wirusa Zachodniego Nilu (WNV, *West Nile virus*) i wirusa dengi (DENV, *Dengue virus*).

Obie metody zmniejszają ryzyko przeniesienia *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* i *Babesia microti*, a pilotażowe badania wykazały, że metoda inaktywacji z PEN 110 ogranicza także liczbę patologicznych prionów (o 4 log).

Na podstawie wyników pilotażowych badań, takich jak całkowite zahamowanie ekspresji antygeny CD69 oraz całkowite zahamowanie proliferacji limfocytów w hodowli mieszanej limfocytów (MLC), stwierdzono, że metoda z inaktywną i metoda z S-303 prawdopodobnie zapobiegają poprzetoczeniowej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (TA-GvHD, *Transfusion Associated Graft versus Host Diseases*) i mogą w związku z tym stanowić alternatywę dla napromieniania [11, 12].

Toksyczność metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w koncentracji krwinek czerwonych

Pierwsze badania oceniające toksyczność UKKCz poddanych inaktywacji metodą z inaktywną (PEN 110), przeprowadzone na modelu zwierzęcym, były zadowalające. Nie stwierdzono negatywnego wpływu inaktywowanych UKKCz, nawet przy pominięciu etapu odpłukania inaktywny. Jednakże kolejne etapy badań klinicznych zostały wstrzymane, ponieważ zaobserwowano, że inaktywowane UKKCz powodowały powstawanie przeciwciał u pacjentów z niedokrwistością sierpowatokrwinkową, szczególnie u tych, którym wielokrotnie przetaczano poddane inaktywacji KKCz z powodu zabiegów chirurgicznych. Pojawienie się nowych epitopów po przetoczeniu inaktywowanych KKCz metodą z inaktywną wydaje się być konsekwencją zmian zachodzących w błonie komórkowej krwinek czerwonych.

Nie zaobserwowano także objawów toksyczności i nie stwierdzono odpowiedzi immunologicznej

w postaci wytwarzania przeciwciał u zwierząt, którym wielokrotnie przetaczano KKCz poddane inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych metodą z S-303. Dopiero podczas III fazy badań klinicznych, w której pacjentom przetaczano KKCz inaktywowane przy użyciu metody z S-303 (metoda pierwszej generacji), stwierdzono immunoreaktywność w stosunku do przetaczanych składników krwi. Immunoreaktywność była spowodowana wytworzeniem przeciwciał przeciwko pochodzącej ze związku S-303 akrydynie, która opłaszczała powierzchnię krwinek czerwonych. Stwierdzono ponadto, że w przypadku wielokrotnych przetoczeń ryzyko immunoreaktywności znacznie wzrastało.

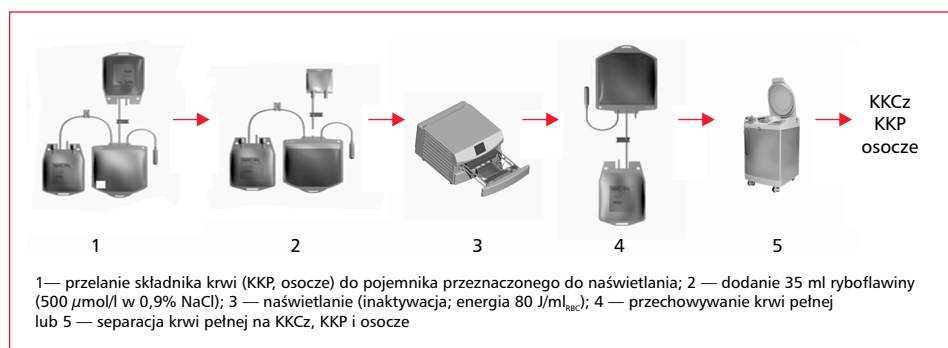
Po pierwszych obserwacjach dotyczących tworzenia przeciwciał przeciwko inaktywowanym KKCz u pacjentów z przewlekłą niedokrwistością metodę inaktywacji z S-303 zmodyfikowano, wprowadzając do mieszaniny reakcyjnej większą ilość glutationu o obojętnym pH (zamiast zredukowanego, niezbuforowanego glutationu) [13–16].

Jakość koncentratu krwinek czerwonych poddanych inaktywacji metodą z S-303

Koncentrat krwinek czerwonych poddanych procesowi inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych metodą z S-303 charakteryzował się niewielką stratą krwinek czerwonych, obniżeniem stężenia hemoglobiny oraz znacząco mniejszym stężeniem mleczanów i niższą wartością pH w trakcie przechowywania. Zarówno w poddanych inaktywacji KKCz, jak i w KKCz niepoddanych inaktywacji (grupa kontrolna) nie stwierdzono różnic w morfologii i ekspresji antygeny CD47 na powierzchni krwinek czerwonych. W obu badanych grupach stwierdzono natomiast niskie stężenie 2,3-DPG oraz podobne wartości parametrów określających stopień hemolizy, zużycie glukozy i wydzielanie potasu [17, 18].

Metoda z zastosowaniem S-303 — badania kliniczne

Podczas I fazy badań klinicznych KKCz poddanych inaktywacji metodą z S-303 (zarówno I, jak i II generacja) i przechowywanych przez 35 dni przed przetoczeniem zaobserwowano porównywalne z grupą kontrolną, ponad 75% odzyskanie krwinek czerwonych po 24 godz. W żadnym przypadku nie zaobserwowano odpowiedzi immunologicznej. Obecnie metoda z S-303 (II generacja systemu) jest w trakcie ostatniej fazy badań klinicznych, w której analizie są poddawane przetoczenia poddawanych inaktywacji



Rycina 2. Proces inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej przy zastosowaniu systemu Mirasol®PRT (dzięki uprzejmości firmy Terumo BCT; USA)

Figure 2. Pathogen inactivation process for whole blood in Mirasol PRT System (courtesy of Terumo BCT; USA)

z S-303 KKCz, wykonywane u pacjentów z ostrymi i przewlekłymi niedokrwistościami [19, 20].

Metoda inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej

System Mirasol, stosowany od lat w celu inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w osoczu i w KKP, zmodyfikowano w taki sposób, aby umożliwić inaktywację biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej. W metodzie, opartej na reakcji fotodynamicznej, zastosowano ryboflawinę (fotouczulacz) i UV. Proces inaktywacji krwi pełnej z zastosowaniem systemu Mirasol przedstawiono na rycinie 2.

Mechanizm reakcji fotodynamicznej

W reakcji fotodynamicznej typu I (reakcja niezależna od tlenu) następuje przeniesienie elektronu lub atomu wodoru bezpośrednio z ryboflawiny na cząsteczkę substratu (kwasy nukleinowe, lipidy błonowe), co w konsekwencji powoduje utworzenie wolnych rodników. Wolne rodniki natychmiast reagują z tlenem, co skutkuje powstawaniem reaktywnych form tlenu (ROS, *Reactive Oxygen Species*), takich jak anionorodniki ponadtlenkowe (O_2^-) i rodniki wodoronadtlenkowe (HO_2). Reakcja fotodynamiczna typu II (reakcja zależna od tlenu) polega na oddziaływaniu ryboflawiny z tlenem tripletowym, co prowadzi do wytworzenia elektronowo wzbudzonej i wysoce reaktywnej formy tlenu zwanej tlenem singletowym (1O_2). Z analizy mechanizmów reakcji fotodynamicznej wynika, że na przebieg tej reakcji wpływa zarówno stężenie tlenu, jak i stężenie fotouczulacza. Singletowe rodniki tlenowe są przede wszystkim odpowie-

dzialne za uszkodzenia kwasów nukleinowych, co skutkuje pękaniem nici i ich fragmentacją [7, 21].

Skuteczność metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej

W wielu ostatnio ukazujących się pracach przedstawiono wyniki oceniające zarówno skuteczność metody w stosunku do bakterii, wirusów, pasożytów i leukocytów, jak i badania kontroli jakości poddanej inaktywacji krwi pełnej oraz otrzymanych z niej składników krwi.

System Mirasol®PRT całkowicie inaktywuje bakterie najczęściej występujące w KKCz, takie między innymi jak: *S. liquefaciens* i *Y. enterocolitica*. Potwierdzono także skuteczność systemu Mirasol®PRT w stosunku do wirusów bezotoczkowych (wirus choroby niebieskiego języka, BTV; wirus zapalenia wątroby typu A, HAV; psi parwowirus, CPV) oraz w stosunku do wirusów otoczkowych (wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, VSV).

System Mirasol®PRT jest również skuteczny w stosunku do istotnych klinicznie pierwotniaków, takich jak *Plasmodium*, *Leishmania*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*. W przypadku *Trypanosoma cruzi* wykazano redukcję do granicy wykrywalności.

System inaktywuje także leukocyty do granicy ich wykrywalności już przy dawkach energii 33 i 44 J/ml_{RBC}, co udowodniono przy zastosowaniu modelu zwierzęcego. Ludzkie limfocyty T, uprzednio poddane inaktywacji w systemie Mirasol®PRT przeszczepiono myszom, u których nie rozwinęła się GVHD, co wskazuje na to, że system Mirasol®PRT może stanowić alternatywę dla napromieniania krwi pełnej z zastosowaniem radiatora [22].

Jakość składników krwi otrzymanych z krwi pełnej poddanej inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w systemie Mirasol®PRT

W pracy Reddy i Marschner [23] oceniającej jakość poddanej inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych krwi pełnej, przechowywanej w temperaturze pokojowej do 7 dni, stwierdzono nieznaczną, jednak utrzymującą się w zakresie normy hemolizę. Porównując funkcje krwinek płytkowych otrzymanych z inaktywowanej krwi pełnej przechowywanej 7 dni oraz krwinek z grupy kontrolnej, stwierdzono brak znamienych różnic w adhezji i agregacji. W przypadku FFP, otrzymanego z poddanej inaktywacji krwi pełnej, przechowywanego w stanie zamrożenia do 28 dni, stwierdzono, że odzyskanie białek nie było znacząco obniżone, a średnie stężenie fibrynogenu oraz średnie aktywności czynników: V, VIII i XI okazały się nawet wyższe niż w przypadku osocza poddanego procesowi inaktywacji w systemie Mirasol®PRT.

Z kolei w KKCz otrzymanych z krwi pełnej poddanej procesowi inaktywacji zaobserwowano zwiększenie stopnia hemolizy (średnio poniżej 1% w 35. dniu przechowywania), wzrost stężenia potasu i obniżenie stężenia sodu w porównaniu ze standardowymi KKCz [23, 24]. Obecnie system Mirasol®PRT jest oceniany i poddawany walidacji w kilku ośrodkach transfuzjologicznych w Ghanie, gdzie przetaczanie poddanej inaktywacji w systemie Mirasol®PRT krwi pełnej zapobiega rozprzestrzenianiu się malarii tą drogą (28% pobranych donacji zakażonych jest zarodźcami malarii) [25].

Podczas Kongresu Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*), który odbył się w Toronto w dniach 2–6 czerwca 2018 roku, podobnie jak w latach poprzednich wiele uwagi poświęcono metodom inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej przy użyciu systemu Mirasol®PRT. Przedstawiono pracę z ośrodków transfuzjologicznych w Ghanie, w której wykazano, iż wykorzystanie systemu Mirasol obniżyło zakażenie zarodźcem malarii z 22%, gdy przetaczano krew pełną niepoddaną inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych, do 4%, w przypadku gdy krew pełną poddawano inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w systemie Mirasol®PRT [26].

Na podstawie wyników badań otrzymanych przez Schuberta i wsp. stwierdzono także, że KKP uzyskane z krwi pełnej poddanej procesowi inaktywacji wykazują lepsze jakościowo parametry,

niż KKP poddane inaktywacji bezpośrednio. Z kolei KKCz uzyskane z poddanej inaktywacji krwi pełnej charakteryzowały się gorszymi parametrami niż KKCz uzyskane z krwi pełnej niepoddanej inaktywacji. W przypadku FFP obserwowano stratę w aktywności kilku istotnych czynników krzepnięcia (3–44%) [27].

Podczas ISBT w części dotyczącej inaktywacji czynników chorobotwórczych w krwi pełnej zaprezentowano prace z ośrodka w Moskwie, w której dokonano porównania w badaniach *in vitro* parametrów KKCz poddawanych działaniu promieniowania X z parametrami KKCz otrzymanymi z krwi pełnej poddanej inaktywacji w systemie Mirasol®PRT. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w wartości pH, stężeniu hemoglobiny, stężeniu potasu pozakomórkowego, ekspresji fosfatydylseryny, ATP i glutationu pomiędzy KKCz po zastosowaniu promieniowania X, a KKCz otrzymanymi z krwi pełnej poddanej inaktywacji. Stężenia glukozy i mleczanów były znacząco niższe w grupie KKP otrzymanych z krwi pełnej poddanej inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w systemie Mirasol, niż w grupie napromieniowanych KKP, w każdym badanym dniu przechowywania. W 14. dniu przechowywania w KKCz poddanych inaktywacji zaobserwowano wyższe stężenie wolnej hemoglobiny oraz wyższą hemolizę w porównaniu z KKCz napromieniowanymi. W 21. dniu przechowywania w 9 próbkach (36%) z KKCz poddanych inaktywacji odsetek krwinek czerwonych, które uległy hemolizie, przekroczył 0,8%. W napromieniowanych KKCz hemoliza nie przekroczyła 0,8% we wszystkich dniach przechowywania. Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że wartości poszczególnych parametrów kontroli jakości KKCz z obu badanych grup są porównywalne tylko do 14. dnia przechowywania [28].

Podsumowanie

Brak opublikowanych, aktualnych wyników badań odnoszących się do metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych z inaktywną uniemożliwia ocenę stopnia zaawansowania prac dotyczących tej metody. Największe nadzieje wiąże się obecnie z zakończeniem badań klinicznych KKCz poddawanych inaktywacji przy użyciu metody z S-303 i wdrażaniem tej metody do rutynowego stosowania. Z kolei w przypadku wdrożenia metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej do rutynowego stosowania nie tylko krew pełna stanie się bardziej bezpieczna, ale również wszystkie otrzymane z niej

składniki krwi. Należy także podkreślić, że metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKCz i w krwi pełnej (metoda z S-303 i metoda z ryboflawiną) skutecznie inaktywują także limfocyty T, co spowoduje, że w chwili ich wprowadzenia będzie można rozważyć rezygnację z napromieniania komórkowych składników krwi przy użyciu radiatorów.

Na podstawie przedstawionych w niniejszej pracy informacji można stwierdzić, że metoda z S-303 (II generacja systemu) jest w trakcie ostatniej fazy badań klinicznych, w której analizie poddawane są przetoczenia poddawanych inaktywacji z S-303 KKCz, wykonywane u pacjentów z ostrymi i przewlekłymi niedokrwistościami.

Krew pełna poddana inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w systemie Mirasol®PRT jest przetaczana pacjentom (małym dzieciom i kobietom w ciąży) w dwóch ośrodkach w Ghanie (Accra i Kumasi) [29].

Piśmiennictwo

- Hellstern P, Sachse H, Schwinn H, et al. Manufacture and in vitro characterization of a solvent/detergent-treated human plasma. *Vox Sang.* 1992; 63(3): 178–185, indexed in Pubmed: [1448962](#).
- Mohr H, Lambrecht B, Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunol Invest.* 1995; 24(1-2): 73–85, indexed in Pubmed: [7713607](#).
- Prowse CV. Component pathogen inactivation: a critical review. *Vox Sang.* 2013; 104(3): 183–199, doi: [10.1111/j.1423-0410.2012.01662.x](#), indexed in Pubmed: [23134556](#).
- Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: an update. *Transfus Med Hemother.* 2014; 41(4): 309–325, doi: [10.1159/000365646](#), indexed in Pubmed: [25254027](#).
- Heiden M, Seitz R. Pathogen inactivation - regulators aspects. *ISBT Science Series.* 2010; 5(n1): 279–281, doi: [10.1111/j.1751-2824.2010.01382.x](#).
- North J, Neyndorff H, Levy JG. Photosensitizers as virucidal agents. *J Photochem Photobiol B.* 1993; 17(2): 99–108, indexed in Pubmed: [8459322](#).
- Cazenave JP, Naegelen C, Isola H, et al. Council of Europe Expert Committee in Blood Transfusion Study Group on Pathogen Inactivation of Labile Blood Components. Pathogen inactivation of labile blood products. *Transfus Med.* 2001; 11(3): 149–175, indexed in Pubmed: [11422945](#). (Pathogen inactivation of labile blood products. Council of Europe 2001)
- Ben-Hur E, Rywkin S, Rosenthal I, et al. Virus inactivation in red cell concentrates by photosensitization with phthalocyanines: protection of red cells but not of vesicular stomatitis virus with a water-soluble analogue of vitamin E. *Transfusion.* 1995; 35: 401–406.
- O'Brien JM, Gaffney DK, Wang TP, et al. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of enveloped viruses in blood products: site and mechanism of phototoxicity. *Blood.* 1992; 80(1): 277–285, indexed in Pubmed: [1319237](#).
- Purmal A, Valeri CR, Dzik W, et al. Process for the preparation of pathogen-inactivated RBC concentrates by using PEN110 chemistry: preclinical studies. *Transfusion.* 2002; 42(2): 139–145, indexed in Pubmed: [11896326](#).
- Henschler R, Seifried E, Mufti N. Development of the S-303 Pathogen Inactivation Technology for Red Blood Cell Concentrates. *Transfus Med Hemother.* 2011; 38(1): 33–42, doi: [10.1159/000324458](#), indexed in Pubmed: [21779204](#).
- Mather T, Takeda T, Tassello J, et al. West Nile virus in blood: stability, distribution, and susceptibility to PEN110 inactivation. *Transfusion.* 2003; 43(8): 1029–1037, indexed in Pubmed: [12869107](#).
- AuBuchon JP, Pickard CA, Herschel LH, et al. Production of pathogen-inactivated RBC concentrates using PEN110 chemistry: a Phase I clinical study. *Transfusion.* 2002; 42(2): 146–152, indexed in Pubmed: [11896327](#).
- Chapman JR, Moore K, Butterworth BE. Pathogen inactivation of RBCs: PEN110 reproductive toxicology studies. *Transfusion.* 2003; 43(10): 1386–1393, indexed in Pubmed: [14507269](#).
- Conlan MG, Lin L-S, Stassinopoulos A. Investigation of immunoreactivity observed after transfusion of S-303 RBCs in 2 phase III clinical trials in support of acute or chronic anemia. *Transfusion* 2005, 45 (3suppl), 29A.
- North AK, Castro G, Erickson A, et al. Characterization of antibodies to red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment. *Vox Sang.* 2007; 93(suppl 1): 167–168.
- Winter KM, Johnson L, Kwok M, et al. Red blood cell in vitro quality and function is maintained after S-303 pathogen inactivation treatment. *Transfusion.* 2014; 54(7): 1798–1807, doi: [10.1111/trf.12545](#), indexed in Pubmed: [24617658](#).
- Henschler R, Janetzko K, Erterek B, et al. Characterization of red cell concentrates treated with the S-303 pathogen inactivation system and stored in saline adenine glucose-mannitol (SAGM) *Vox Sang.* 2010; 99(suppl 1): 38.
- Cancelas JA, Rugg N, Dumont LJ, et al. Comprehensive evaluation of a new process for S-303 pathogen-inactivation of red blood cells. *Transfusion.* 2010; 50(suppl): 9A.
- Cancelas JA, Dumont LJ, Rugg N, et al. Stored red blood cell viability is maintained after treatment with a second-generation S-303 pathogen inactivation process. *Transfusion.* 2011; 51(11): 2367–76.
- Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, et al. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies. *Photochem Photobiol.* 2014; 90(5): 957–964, doi: [10.1111/php.12311](#), indexed in Pubmed: [25041351](#).
- Marschner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2011; 38(1): 8–18, doi: [10.1159/000324160](#).
- Reddy H, Marschner S, Doane S, et al. Room temperature storage of whole blood treated with the Mirasol System. *Vox Sang.* 2010; 99: p243.
- Reddy H, Doane S, Spotts C, et al. In vitro assessments of platelet function in whole blood treated with the Mirasol System and stored at room temperature. *Vox Sang.* 2010, 99, p 243.
- Cancelas J, Rugg N, Worsham DN, et al. Quality assessment of stored RBC after treatment of whole blood with the Mirasol System. *Transfusion.* 2010; 50(suppl): p71A.
- Allain JP, Owusu-Ofori A, Assenato S, et al. Effect of Plasmodium inactivation in whole blood on the incidence of blood transfusion-transmitted malaria in endemic regions: the African

- Investigation of the Mirasol System (AIMS) randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016; 387(10029): 1753–1761, doi: [10.1016/s0140-6736\(16\)00581-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00581-x).
27. Schubert P, Culibrk B, Karwal S, et al. Whole blood treated with riboflavin and ultraviolet light: quality assessment of all blood components produced by the buffy coat method. *Transfusion*. 2014; 55(4): 815–823, doi: [10.1111/trf.12895](https://doi.org/10.1111/trf.12895).
28. Kumukova I, Trakhtman P, Starostin N, et al. Comparison of laboratory parameters of pathogen reduced and irradiated RBC suspension. *Vox Sang*. 2018; 113 (1): 5-347. (p.169).
29. Allain JP, Goodrich R. Pathogen reduction of whole blood: utility and feasibility. *Transfus Med*. 2017; 27 Suppl 5: 320–326, doi: [10.1111/tme.12456](https://doi.org/10.1111/tme.12456), indexed in Pubmed: [28875531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28875531/).