

# Leukocyty a metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

Elżbieta Lachert 

Pracownia Zapewnienia Jakości, Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Lachert E. Leukocytes and pathogen inactivation methods. *J Trans Med* 2020; 13 (2): 113–119. DOI: 10.5603/JTM.2020.0003.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

Przetoczenie składników krwi z zawartymi w nich leukocytami może wywołać u biorcy wiele niepożądanych reakcji opartych na mechanizmach o charakterze immunologicznym, takich jak: potransfuzyjna choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (TA-GvHD), niehemolityczne gorączkowe reakcje poprzetoczeniowe (FNHTRs), spowodowane uwalnianiem się cytokin oraz alloimmunizacja biorcy antygenami HLA, co prowadzi do powstawania u biorcy przeciwciał anty-HLA, które mogą być przyczyną oporności na przetaczane KKP. W celu ograniczenia ryzyka związanego z obecnością resztkowych leukocytów w przetaczanych składnikach krwi od lat są stosowane różne metody preparatyki, które obniżają liczbę leukocytów lub je inaktywują. Należą do nich: leukoredukcja, stosowanie promieniowania gamma oraz metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych. Na podstawie intensywnego rozwoju badań nad inaktywacją biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi stwierdzono, że stosowane rutynowo metody inaktywacji w osoczu i w KKP — Mirasol i Intercept — skutecznie inaktywują także limfocyty T. W związku z powyższym metody te mogą stanowić alternatywę dla napromieniania. Podobnie metoda inaktywacji z UVC, po wprowadzeniu do rutynowego stosowania, będzie mogła zastąpić powszechnie stosowany radiator. Jednocześnie stwierdzono, że metody inaktywacji nie tylko zabezpieczają przed TA-GvHD, ale również hamują syntezę cytokin, które odpowiadają przede wszystkim za niehemolityczne gorączkowe reakcje poprzetoczeniowe.

**Słowa kluczowe:** leukocyty, metody inaktywacji, poważne niepożądane reakcje

*J. Transf. Med.* 2020; 13: 105–112

## Poważne niepożądane reakcje

Przetoczenie składników krwi z zawartymi w nich leukocytami może wywołać u biorcy wiele niepożądanych reakcji opartych na dwóch podstawowych mechanizmach o charakterze immunologicznym. Pierwszy z nich występuje wtedy, gdy leukocyty zawarte w przetaczanych składnikach krwi stymulują reakcję w komórkach i tkankach biorcy, wywołując na przykład ciężką niepożądaną reakcję, jaką jest potransfuzyjna choroba

przeszczep przeciw gospodarzowi (TA-GvHD, *transfusion associated-graft versus host diseases*) lub niehemolityczne gorączkowe reakcje poprzetoczeniowe (FNHTRs, *febrile non hemolytic transfusion reactions*) spowodowane uwalnianiem się cytokin. Drugi mechanizm jest związany z rozpoznaniem obcych antygenów HLA na leukocytach dawcy przez komórki T biorcy, które w obecności cząstek głównego układu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex*) obecnych na komórkach prezentujących antygen u dawcy (APC,

**Adres do korespondencji:** dr hab. n. med. Elżbieta Lachert, Pracownia Zapewnienia Jakości, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 82, faks: 22 349 63 76, e-mail: elachert@ihit.waw.pl

**Tabela 1.** Poważne niepożądane reakcje po przetoczeniu składników krwi

Niepożądane reakcje poprzetoczeniowe	Czynnik odpowiedzialny
Poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciwko biorcy (TA-GvHD, <i>transfusion-associated graft versus host disease</i> )	Immunokompetentne limfocyty T dawcy
Alloimmunizacja antygenami układu HLA	Leukocyty dawcy
Gorączkowa niehemolityczna reakcja poprzetoczeniowa (FNTHR, <i>febrile nonhemolytic transfusion reaction</i> )	Cytokiny uwalniane z leukocytów dawcy
Poprzetoczeniowa ostra niewydolność oddechowa (TRALI, <i>transfusion related acute lung injury</i> )	Przeciwciała dawcy/biorcy (anty-HLA klasy I lub klasy II i przeciwciała anty-granulocytarne)
Przeniesienie czynników zakaźnych	Czynniki zakaźne związane z leukocytami (np. CMV, HTLV 1/2)

*antigen presenting cells*) (droga bezpośrednia) lub na APC biorcy (droga pośrednia) rozpoznają nieznane antygeny HLA. Takie mechanizmy rozpoznania obcego antygeny HLA dawcy przez limfocyty T biorcy prowadzą do powstawania u biorcy przeciwciał anty-HLA, które mogą być przyczyną oporności u pacjentów na przetaczane KKP.

W celu ograniczenia ryzyka związanego z obecnością resztkowych leukocytów w przetaczanych składnikach krwi od lat są stosowane różne metody preparatyki, które skutkują obniżeniem liczby leukocytów lub ich inaktywacją, a w konsekwencji zabezpieczają biorców między innymi przed alloimmunizacją antygenami układu HLA, gorączkowymi niehemolitycznymi reakcjami poprzetoczeniowymi lub potransfuzyjną chorobą przeszczep przeciw gospodarzowi. Z analizy danych pochodzących z systemów czuwania nad bezpieczeństwem krwi (HV, *haemovigilance*) zarówno na poziomie krajowym, jak i europejskim nadal jednak wynika, że zawartość choćby niewielkiej liczby leukocytów w przetaczanych składnikach krwi może powodować u biorcy poważne niepożądane reakcje poprzetoczeniowe (tab. 1) [1, 2].

### Potransfuzyjna choroba przeszczep przeciw gospodarzowi

Potransfuzyjna choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (TA-GvHD, *transfusion-associated graft versus host disease*) jest jedną z najcięższych niepożądanych reakcji spowodowanych przetoczeniem immunokompetentnych, allogenicznych limfocytów T do organizmu biorcy, którego system immunologiczny nie jest zdolny do ich zniszczenia lub dawca jest homozygotą pod względem jednego z haplotypów układu HLA biorcy. Powikłanie TA-GvHD występuje na skutek uszkodzeń tkanek biorcy powstałych w wyniku interakcji pomiędzy komórkami układu immunologicznego dawcy i biorcy. W procesie niszczenia komórek gospodarza

przez limfocyty zawarte w przetoczonym składniku krwi uczestniczą różne subpopulacje limfocytów, interleukiny, cytokiny prozapalne i cząstki adhezyjne. Na początku komórki dendrytyczne i makrofagi biorcy, pełniące fizjologiczną funkcję komórek APC, prezentują jego antygeny HLA przetoczonym limfocytom T. Wydzielana przez makrofagi interleukina-1 (IL-1) i czynnik pobudzający tymocyty aktywują pomocnicze limfocyty T CD4+, które wydzielają interleukinę-2 (IL-2) pobudzającą z kolei limfocyty CD 8+. Aktywacja limfocytów T jest sygnałem stymulującym uwalnianie cytokin z różnych komórek, w wyniku czego dochodzi do klonalnej proliferacji limfocytów T, które różnicują się na komórki cytolityczne lub komórki wydzielające limfokiny. Na tym etapie występuje niekontrolowane wydzielanie ogromnej ilości cytokin bezpośrednio oddziałujących na komórki docelowe biorcy lub działających pośrednio przez pobudzenie komórek linii hematopoetycznej, takich jak: limfocyty B, limfocyty cytotoksyczne czy makrofagi. Komórki te stają się wtórnymi efektorami i razem z cytokinami powodują uszkodzenia, a następnie śmierć komórki docelowej biorcy [3, 4].

Wprawdzie poprzetoczeniowe TA-GvHD występuje stosunkowo rzadko (zachorowalność ocenia się w przybliżeniu na 0,1–1% wszystkich niepożądanych reakcji wg analizy SHOT i to przede wszystkim u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego i chorobami limfoproliferacyjnymi), to ze względu na brak skutecznego leczenia i wysoką śmiertelność (> 90%) powikłanie to stanowi poważny problem w praktyce klinicznej. Stwierdzono także, że nawet filtry najnowszej generacji stosowane do usuwania leukocytów z komórkowych składników krwi nie zabezpieczają przed rozwinięciem TA-GvHD, ponieważ liczba leukocytów, która może pozostać w preparacie (< 1 × 10<sup>6</sup>), jest wystarczająca do wywołania tego powikłania. Jak dotychczas, jedyną skuteczną

**Tabela 2.** Pacjenci z grupy ryzyka TA-GvHD według prawdopodobieństwa jego wystąpienia

Udowodnione ryzyko	Możliwe ryzyko	Nieokreślone ryzyko
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biorcy allo- i autologicznych przeszczepów szpiku</li> <li>• Osoby z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi</li> <li>• Dopłodowe transfuzje wewnątrzmaciczne</li> <li>• Osoby otrzymujące składniki krwi od spokrewnionych osób (I i II stopień)</li> <li>• Osoby z ziarnicą złośliwą (chorobą Hodgkina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wcześniaki</li> <li>• Osoby z chorobami hematologicznymi innymi niż ziarnica złośliwa</li> <li>• Osoby z guzami litymi</li> <li>• Biorcy po przeszczepieniu narządów</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AIDS</li> <li>• Noworodki urodzone o czasie</li> </ul>

metodą zabezpieczającą pacjentów z grup ryzyka przed rozwinięciem TA-GvHD było poddawanie komórkowych składników krwi działaniu promieniowania jonizującego gamma lub promieniowania X w specjalnie do tego celu zaprojektowanych radiatorach ( $Cs^{137}$ ,  $Co^{60}$  lub X) [5–9].

Na podstawie intensywnego rozwoju badań nad inaktywacją biologicznych czynników chorobotwórczych w składnikach krwi stwierdzono, że niektóre metody stosowane w tym celu można zastosować również do skutecznej inaktywacji limfocytów T. W związku z powyższym metody te mogą stanowić alternatywę dla napromieniania [10]. Zasadą tych metod jest tworzenie nieodwracalnych zmian w kwasach nukleinowych wirusów, bakterii, pasożytów i leukocytów poprzez zahamowanie ich namnażania. W światowym piśmiennictwie potwierdzono skuteczność inaktywacji krwinek białych przy użyciu rutynowo stosowanych systemów inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKP (Intercept i Mirasol), a tym samym potwierdzono możliwość zastąpienia napromieniania KKP, przeznaczonych dla pacjentów z grup ryzyka, jednym z wyżej wymienionych systemów. W związku z powyższym, w niektórych krajach (m.in. Francja, Hiszpania, Austria, Luksemburg, Katar, Polska), w których stosuje się metody inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP przy użyciu systemów Mirasol lub Intercept, w przypadku konieczności przygotowania KKP dla pacjentów z grup ryzyka TA-GvHD, a KKP jest już poddane inaktywacji, nie powinno się preparatu tego dodatkowo poddawać procedurze napromieniania [11]. Założenie, że metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKCz lub krwi pełnej (PEN 110, S-303, ryboflawina), które są w trakcie opracowywania lub badań klinicznych równie skutecznie inaktywują krwinki białe, znaj-

duje potwierdzenie w wynikach wielu badań [12]. W przypadku wdrożenia tych metod do rutynowego stosowania można by zrezygnować z obecnie stosowanego promieniowania jonizującego gamma lub promieniowania X, emitowanych ze specjalnie do tego celu zaprojektowanych radiatorów. Zgodnie z wytycznymi Państwowej Agencji Atomistyki (PAA) i w sytuacji stale rosnącego zagrożenia terroryzmem eksploatacja radiatora wiąże się z koniecznością ciągłego monitorowania wysokoaktywnego źródła promieniotwórczego. Dodatkowo promieniowanie jonizujące gamma powoduje zmniejszenie właściwości funkcjonalnych krwinek czerwonych (wyciek wewnątrzkomórkowego potasu do przestrzeni pozakomórkowej, hemoliza), które nasilają się w miarę upływu czasu ich przechowywania. W związku z tym zalecane jest przeprowadzanie procesu napromieniania (radiator) składników krwi przeznaczonych dla pacjentów z grup ryzyka rozwinięcia TA-GvHD (tab. 2) bezpośrednio przed przetoczeniem. Niektóre wyniki badań dotyczące inaktywacji leukocytów przy zastosowaniu rutynowo stosowanych systemów lub metod będących w trakcie badań sugerują, że oprócz zapobiegania TA-GvHD metody te zapobiegają również alloimmunizacji antygenami HLA i gorączkowym niehemolitycznym reakcją przetoczeniową (FNHTR) [13, 14].

### Alloimmunizacja

W raporcie z badań *Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets* (TRAP) opisano brak odzyskania krwinek płytkowych w krążeniu biorcy zarówno po 1, jak i po 24 godzinach, licząc od czasu przetoczenia KKP, co w konsekwencji spowodowało konieczność zwiększenia częstości przetoczeń. Zjawisko to próbowano tłumaczyć pojawieniem się przeciwciał u biorcy, ale wyniki testów limfocytotoksyczności

wykazały, że zmniejszone odzyskanie krwinek płytkowych występuje zarówno w przypadku obecności, jak i braku przeciwciał antyleukocytarnych. Ponowna analiza danych wykazała różnice w liczbie krwinek płytkowych u biorcy po przetoczeniu w zależności od rodzaju przetaczanych KKP. Stwierdzono większe odzyskanie krwinek płytkowych, po zastosowaniu ubogoleukocytarnych lub poddanych działaniu UV KKP, niż po zastosowaniu standardowego KKP. Leukocyty zanieczyszczające KKP uznano zatem za prawdopodobną przyczynę alloimmunizacji antygenami HLA, która prowadzi do oporności na przetoczenia KKP, szczególnie występujących u pacjentów, którym wielokrotnie przetaczano KKP. W wielu badaniach potwierdzono natomiast, że promieniowanie gamma nie zabezpiecza przed powstawaniem alloprzeciwciał. Obecnie jednym ze sposobów postępowania jest stosowanie ubogoleukocytarnych składników krwi lub dobieranie KKP dla biorcy zgodnych w układzie HLA z dawcą. Jednak procedur tych nie stosuje się rutynowo [15–17].

### Gorączkowe niehemolityczne reakcje poprzetoczeniowe

Gorączkowe niehemolityczne reakcje poprzetoczeniowe (FNTHR, *febrile nonhemolytic transfusion reaction*) po przetoczeniu KKCz najczęściej są spowodowane obecnością leukocytów w przetaczanym składniku krwi oraz przeciwciał antyleukocytarnych wykrywanych u pacjentów. Na skutek reakcji antygen-przeciwciało-komplement aktywowane są makrofagi biorcy. Skutkiem tych oddziaływań jest wydzielanie cytokin, których stężenie wzrasta proporcjonalnie do liczby leukocytów zawartych w KKP oraz czasu przechowywania preparatu przed przetoczeniem. Heddle udowodnił, że jedną z najczęstszych przyczyn FNTHR jest podwyższone stężenie cytokin: interleukiny-1beta (IL- $\beta$ 1) i interleukiny-6 (IL-6) w przechowywanych KKP. Powikłaniom tym można zapobiegać, usuwając leukocyty nie później niż do 6 godzin od chwili otrzymania KKP [18].

Częstość występowania FNHTR po przetoczeniu nieubogoleukocytarnego KKCz szacuje się na 0,12–0,5%, natomiast w przypadku przytoczeń nieubogoleukocytarnych KKP częstość jest znacząco wyższa i wynosi 1,7–31%. Potwierdzono także związek pomiędzy wysoką zawartością IL-1 $\alpha$ , IL-6 oraz TNF- $\alpha$  a zawartością krwinek białych powyżej  $3 \times 10^6/l$  w KKP. Chociaż stosowanie filtracji lub usunięcie osocza znacząco zmniejsza stężenie cytokin, a tym samym obniża częstotliwość występowania FNTHR, to niepożądane reakcje spowodowane zanieczyszczeniami leukocytarnymi,

pomimo przetoczenia UKKP, sporadycznie nadal się zdarzają. Muylle i wsp. przeanalizowali zabiegi przetoczeń przeprowadzonych u 45 pacjentów, którzy wprawdzie otrzymywali UKKP, a pomimo to u 13% z nich stwierdzono gorączkowe reakcje spowodowane znaczącym podwyższeniem TNF- $\alpha$  i IL-6 w UKKP [2, 19, 20].

W trakcie przechowywania KKP, oprócz wydzielania leukocytopochodnych cytokin, dochodzi także do wydzielania z ziarnistości alfa i ziarnistości gęstych krwinek płytkowych chemokin, będących przyczyną reakcji alergicznych. Należą do nich pochodzące z płytek: CCL3 (MIP-1, *macrophage inflammatory protein*), CCL5 (RANTES, *regulated upon activation and normal T cel expressed and secreted*), CXCL4 (PF4, *platelet factor4*), TGF-Beta1-transformujący czynnik wzrostu beta 1. Niektóre z tych cytokin, na przykład CCL5 (RANTES) uczestniczą w powstawaniu niehemolitycznych, alergicznych lub prozapalnych reakcji po przetoczeniu UKKP, spowodowanych między innymi ich zdolnością przyciągania i pobudzania ludzkich granulocytów kwasochłonnych oraz indukowania wydzielania histaminy z ludzkich granulocytów zasadochłonnych. Oceniono, że w przypadku wystąpienia reakcji alergicznych zakres RANTES wynosi 200–1000 ng/ml [21–23].

### Potransfuzyjna ostra niewydolność oddechowa

Potransfuzyjna ostra niewydolność oddechowa (TRALI, *transfusion related acute lung injury*) jest bardzo ciężkim powikłaniem, charakteryzującym się dusznością (obrzęk płuc z niedotlenieniem) występującą podczas przetoczenia lub do 72 godzin od momentu przetoczenia krwi. Nielezione TRALI prowadzi do śmierci u około 25% chorych. Częstość występowania TRALI nie jest dokładnie poznana, ale szacuje się na około 1/1500–5000 przetoczeń. Szczególnie narażeni na to powikłanie są pacjenci w stanie krytycznym (6–8%). Zespół TRALI obserwowano po przetoczeniu wszystkich rodzajów składników krwi oraz immunoglobulin podawanych drogą dożylną. Patogeneza zespołu TRALI nie jest do końca wyjaśniona. W większości przypadków przyczyną są przeciwciała leukocytarne, najczęściej anty-HLA klasy I i II lub swoiste przeciwciała antygranulocytarne (HNA, *human neutrophil antigens*) (anty-HNA-1a, 1b, 2a, 3a). Czynnikiem aktywującymi neutrofile w przetaczanych składnikach krwi mogą być nie tylko przeciwciała antyleukocytarne, ale także biologicznie aktywne lipidy, lizofosfatydylocholina (L-PC) lub cytokiny, które gromadzą się w trakcie przechowywania składników krwi [24–26].



## Zanieczyszczenia leukocytarne a metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych

### Inaktywacja leukocytów z zastosowaniem systemu Mirasol®PRT

Wyniki wielu badań potwierdziły, że metoda inaktywacji zastosowana w systemie Mirasol PRT skutecznie inaktywuje także leukocyty, w tym limfocyty T, których przetoczenie wraz ze składnikami krwi stwarza ryzyko wystąpienia TA-GvHD u biorcy. Stopień inaktywacji limfocytów T określano, wykorzystując między innymi metodę ograniczonych rozcieńczeń (LDA, *limiting dilution assay*) lub oznaczając ekspresję antygenu CD69, wczesnego markeru aktywacji limfocytów T, uczestniczącego w przekazywaniu sygnału aktywującego, co w konsekwencji prowadzi do syntezy różnych cytokin (m.in. IL-2, INF- $\gamma$ ). Stosując metodę LDA, stwierdzono, że po zastosowaniu systemu Mirasol®PRT liczba żywotnych limfocytów T obniżyła się o ponad 6 log. Stwierdzono także, że system Mirasol®PRT hamuje zdolność limfocytów T do aktywacji, czego dowodem jest całkowity brak ekspresji CD69 w komórkach poddanych inaktywacji w tym systemie ( $1,7 \pm 1,3\%$  w porównaniu z ekspresją CD69 w grupie komórek kontrolnych), w których ekspresja tego antygenu wynosiła  $64,4 \pm 15,6\%$  [27].

Jednocześnie, z wielu badań *in vitro* wynika, że leukocyty poddane procesowi inaktywacji w systemie Mirasol®PRT nie są zdolne do stymulowania lub przyłączania komórek allogenicznych. Okazało się, że w odróżnieniu od leukocytów poddanych działaniu promieniowania jonizującego gamma, leukocyty poddane inaktywacji w systemie Mirasol®PRT tracą zdolność do działania jako komórki prezentujące antygen (APC, *antigen presenting cells*). Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że ekspresja kilku receptorów powierzchniowych: HLA-DR, ICAM 1–3, CD80 i CD86 odpowiedzialnych za aktywację i adhezję limfocytów T ulega znaczącemu zmniejszeniu. Potwierdzono także, że w leukocytach poddanych inaktywacji z zastosowaniem ryboflawiny i UV zauważono nieznaczne obniżenie ekspresji antygenów powierzchniowych HLA klasy II i cząsteczek kostymulujących oraz znaczące obniżenie ekspresji licznych cząsteczek adhezyjnych w komórkach prezentujących antygen. Zaobserwowano również niemal całkowitą utratę immunogenności [28].

W badaniach, których celem było sprawdzenie, czy zastosowanie systemu Mirasol®PRT zmniejsza ryzyko wystąpienia gorączkowych niehemolitycznych reakcji poprzetoczeniowych (FNTHR), stwierdzono znaczące zahamowanie syntezy cy-

tokin: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p70 w grupie jednojądrzastych komórek poddanych inaktywacji w systemie Mirasol®PRT, w przeciwieństwie do jednojądrzastych komórek zarówno z grupy kontrolnej, jak i grupy poddanych działaniu promieniowania jonizującego gamma [29].

### Inaktywacja leukocytów z zastosowaniem systemu Intercept

Już pierwsze wyniki badań *in vitro* i *in vivo* potwierdziły, że metoda z zastosowaniem chlorowodoru amotosalenu i UVA skutecznie inaktywuje także leukocyty, a szczególnie leukocyty jednojądrzaste (MNCs, *mononuclear cells*), takie jak limfocyty T. W przypadku zastosowania LDA w próbkach pobranych po inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w KKP w systemie Intercept ( $150 \mu\text{M}$  S-59 i  $3 \text{ J/cm}^2$ ) stwierdzono obniżenie liczby żywotnych limfocytów T o 5,4 log oraz brak formowania kolonii limfocytów T (*colony-forming*). W celu określenia marginesu bezpieczeństwa fotochemicznej metody dla limfocytów T przeprowadzono dodatkowe badania, stosując mniejsze dawki chlorowodoru amotosalenu (S-59). Badania te wykazały wyjątkową wrażliwość limfocytów T na działanie metody fotochemicznej. Chlorowodorek amotosalenu w dawce 1500–3000 razy niższej niż rutynowo stosowana w systemie Intercept oraz około 2 razy mniejszej dawce UV (niż dawka wirusobójcza) inaktywował limfocyty T do granicy oznaczalności.

System Intercept, podobnie jak system Mirasol, hamuje ekspresję CD 69. Fiebig i wsp. oznaczali ekspresję antygenu CD69 w próbkach KKP kontrolnych, w próbkach KKP poddanych działaniu promieniowania jonizującego gamma i w próbkach poddanych inaktywacji w systemie Intercept. W limfocytach T poddanych działaniu promieniowania jonizującego gamma oraz w limfocytach T poddanych inaktywacji w systemie Intercept stwierdzono natychmiastowe obniżenie ekspresji CD69 — odpowiednio do 21% i 12% (przy średniej ekspresji grupy kontrolnej — 82%) [30, 31].

W badaniach *in vitro* potwierdzono także zahamowanie syntezy cytokin w wyniku zastosowania systemu Intercept. Porównywano stężenie interleukiny-8 (IL-8) w 3 grupach KKP przechowywanych do 7 dni (kontrolnej, KKP poddanych działaniu promieniowania jonizującego gamma i KKP poddanych inaktywacji w systemie Intercept). Stwierdzono znamienne wyższe stężenie IL-8 zarówno w KKP z grupy kontrolnej, jak i w KKP poddanych napromienianiu w radiatorze. W badaniach Hei i wsp. potwierdzono, że system Intercept

hamuje syntezę IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6. Należy podkreślić, że do wydzielania cytokin przyczyniają się również bakterie, których skuteczna inaktywacja w systemie Intercept przed przekazaniem KKP do przechowywania dodatkowo zapobiega niehemolitycznym gorączkowym reakcjom poprzetoczeniowym. Wyniki badań z wielu ośrodków naukowych potwierdziły, że system Intercept całkowicie hamuje syntezę cytokin i w odróżnieniu od promieniowania jonizującego gamma, które obniża syntezę cytokin zaledwie o 40%, może stanowić dodatkowe zabezpieczenie przed rozwinieniem FNTHR [22, 23, 32, 33].

### Inaktywacja leukocytów z zastosowaniem innych metod inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych

Metodą, niewprowadzoną wprawdzie jeszcze do rutynowego stosowania, ale poddaną ocenie skuteczności w stosunku do krwinek białych, jest metoda z UVC zastosowana w systemie Theraflex UV-Platelets. Już na podstawie wyników pierwszych badań (ksenogeniczny model myszy) można stwierdzić, że UVC zastosowane w systemie Theraflex UV-Platelets jest tak samo skuteczne jak rutynowo stosowane promieniowanie gamma. Stwierdzono, że zastosowanie nawet połowy dawki stosowanej rutynowo inaktywuje limfocyty T. Jednocześnie prowadząc badania *in vitro*, nie stwierdzono proliferacji jednojądrzastych krwinek białych (po stymulacji PHA, anty CD3 i anty CD28 w mieszanej hodowli limfocytów), gdy zastosowano zarówno dawkę 0,1 J/cm<sup>2</sup>, jak i 0,2 J/cm<sup>2</sup> (dawka stosowana rutynowo w systemie Theraflex UVC), co wskazuje, że już niższa dawka 0,1 J/cm<sup>2</sup> całkowicie znosi zdolność proliferacyjną jednojądrzastych krwinek białych, w przeciwieństwie do jednojądrzastych krwinek białych wyizolowanych z KKP poddanych działaniu promieniowania gamma. Można zatem założyć, że zastosowanie promieniowania UVC zapobiega proliferacji limfocytów T, odpowiedzialnych za rozwinięcie TA-GvHD [34, 35].

Jednocześnie okazało się, że UVC już w dawce 0,1 J/cm<sup>2</sup> zabezpiecza komórki prezentujące antygen przed ich stymulacją komórkami allogeicznymi, a więc wydaje się prawdopodobne, że metoda z zastosowaniem UVC zabezpiecza przed alloimmunizacją. Pogorszenie bezpośredniej prezentacji antygeny przez komórki prezentujące antygen (APCs) może być skutkiem albo obniżenia ekspresji powierzchniowych receptorów krytycznych dla aktywacji i adhezji limfocytów T (charakterystyczne w zapobieganiu alloimmunizacji w przypadku systemu Mirasol) lub uszkodzenia w procesie przetwarzania antygeny [28].

Stwierdzono także, że promieniowanie UVC znacząco obniża stężenie cytokin, takich jak IL-1 $\beta$  i IL-6. Tak silne zahamowanie wydzielania cytokin wystąpiło już po zastosowaniu dawki UVC — 0,1 J/cm<sup>2</sup> (połowa dawki rutynowo stosowanej — 0,2 J/cm<sup>2</sup>) w KKP poddanych procesowi inaktywacji. Synteza IL-8, cytokiny wydzielającej się w trakcie przechowywania KKP, także została znacząco zahamowana po zastosowaniu UVC [18].

W przypadku systemu Mirasol opracowanego w celu inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi pełnej również wykazano, że jest on skuteczny także w stosunku do leukocytów. Stosując energię 33 lub 44 J/ml<sub>KKCz</sub>, stwierdzono inaktywację wyizolowanych z krwi pełnej jednojądrzastych krwinek białych. Ludzkie limfocyty T, uprzednio poddane inaktywacji w systemie Mirasol, przeszczepiono myszom, które nie rozwinęły GVHD, co wskazuje na to, że system Mirasol<sup>®</sup>PRT może stanowić alternatywę dla napromieniania krwi pełnej z zastosowaniem radiatora.

### Podsumowanie

Wyniki badań z różnych ośrodków, zajmujących się metodami inaktywacji czynników zakaźnych w składnikach krwi, przedstawione w niniejszym opracowaniu, potwierdzają, że większość tych metod skutecznie inaktywuje także leukocyty, odpowiedzialne za wiele poważnych niepożądanych reakcji. Metody zastosowane w systemach rutynowo obecnie stosowanych w celu inaktywacji czynników zakaźnych w osoczu i w KKP — Mirasol i Intercept — skutecznie inaktywują także limfocyty T. W związku z powyższym metody te mogą stanowić alternatywę dla napromieniania. Podobnie metoda inaktywacji z UVC, po wprowadzeniu do rutynowego stosowania, będzie mogła zastąpić powszechnie stosowany radiator. Jednocześnie stwierdzono, że metody inaktywacji nie tylko zabezpieczają przed TA-GvHD, ale również hamują syntezę cytokin, które odpowiadają przede wszystkim za niehemolityczne gorączkowe reakcje poprzetoczeniowe.

### Piśmiennictwo

1. Dasararaju R, Marques MB. Adverse effects of transfusion. *Cancer Control*. 2015; 22(1): 16–25, doi: [10.1177/107327481502200104](https://doi.org/10.1177/107327481502200104), indexed in Pubmed: [25504275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25504275/).
2. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, et al. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion*. 2004; 44(1): 10–15, doi: [10.1046/j.0041-1132.2003.00518.x](https://doi.org/10.1046/j.0041-1132.2003.00518.x), indexed in Pubmed: [14692961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14692961/).

3. Poglód R. Poprzetoczeniowa choroba-przeszczep przeciw gospodarzowi. *Acta Haematologica Polonica*. 2009; 40(2): 425–434.
4. Fast LD. Developments in the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2012; 158(5): 563–568, doi: [10.1111/j.1365-2141.2012.09197.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09197.x), indexed in Pubmed: [22734439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22734439/).
5. Dwyre DM, Holland PV. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Vox Sang*. 2008; 95(2): 85–93, doi: [10.1111/j.1423-0410.2008.01073.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2008.01073.x), indexed in Pubmed: [18544121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18544121/).
6. Mintz PD, Wehrli G. Irradiation eradication and pathogen reduction. Ceasing cesium irradiation of blood products. *Bone Marrow Transplant*. 2009; 44(4): 205–211, doi: [10.1038/bmt.2009.124](https://doi.org/10.1038/bmt.2009.124), indexed in Pubmed: [19617907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19617907/).
7. Akahoshi M, Takanashi M, Masuda M, et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion*. 1992; 32(2): 169–172, doi: [10.1046/j.1537-2995.1992.32292180149.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1992.32292180149.x), indexed in Pubmed: [1542924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1542924/).
8. Fast L. Preventing transfusion-associated graft-versus-host disease: state of the art. *International Journal of Clinical Transfusion Medicine*. 2015; 1, doi: [10.2147/ijctm.s76290](https://doi.org/10.2147/ijctm.s76290).
9. Lachert E. : Poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (Ta-GvHD), *Laboratorium Medyczne*. 2019; 2: 25–29.
10. Corash L, Lin L. Novel processes for inactivation of leukocytes to prevent transfusion-associated graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 33(1): 1–7, doi: [10.1038/sj.bmt.1704284](https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704284), indexed in Pubmed: [14647263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14647263/).
11. Grass JA, Hei DJ, Metchette K, et al. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood*. 1998; 91(6): 2180–2188, indexed in Pubmed: [9490707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9490707/).
12. Lachert E. : Zapobieganie poprzetoczeniowej chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (Ta-GvHD), *Laboratorium Medyczne*. 2019; 3: 35–40.
13. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 6 marca 2019 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi.
14. Fast LD, Dileone G, Li J, et al. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion*. 2006; 46(4): 642–648, doi: [10.1111/j.1537-2995.2006.00777.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00777.x), indexed in Pubmed: [16584442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16584442/).
15. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol*. 2008; 142(3): 348–360, doi: [10.1111/j.1365-2141.2008.07189.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07189.x), indexed in Pubmed: [18510692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18510692/).
16. Eisenberg S. Refractory response to platelet transfusion therapy. *J Infus Nurs*. 2010; 33(2): 89–97, doi: [10.1097/NAN.0b013e3181cfd392](https://doi.org/10.1097/NAN.0b013e3181cfd392), indexed in Pubmed: [20228646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20228646/).
17. Ohto H. Gamma radiation does not prevent transfusion-induced HLA alloimmunization. *Transfusion*. 1997; 37(8): 878–879, doi: [10.1046/j.1537-2995.1997.37897424416.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37897424416.x), indexed in Pubmed: [9280338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9280338/).
18. Heddle NM, Klama L, Singer J, et al. The role of the plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med*. 1994; 331(10): 625–628, doi: [10.1056/NEJM199409083311001](https://doi.org/10.1056/NEJM199409083311001), indexed in Pubmed: [8052271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8052271/).
19. Muylle L, Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang*. 1994; 66(1): 14–17, doi: [10.1111/j.1423-0410.1994.tb00270.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1994.tb00270.x), indexed in Pubmed: [8146977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8146977/).
20. Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, et al. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion*. 2004; 44(1): 16–24, doi: [10.1046/j.0041-1132.2004.00608.x](https://doi.org/10.1046/j.0041-1132.2004.00608.x), indexed in Pubmed: [14692962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14692962/).
21. Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Evaluation of White Blood Cell- and Platelet-Derived Cytokine Accumulation in MIRASOL-PRT-Treated Platelets. *Transfus Med Hemother*. 2009; 36(2): 114–120, doi: [10.1159/000203359](https://doi.org/10.1159/000203359), indexed in Pubmed: [20823992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823992/).
22. Klüter H, Bubel S, Kirchner H, et al. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion*. 1999; 39(11-12): 1179–1184, doi: [10.1046/j.1537-2995.1999.39111179.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39111179.x), indexed in Pubmed: [10604243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10604243/).
23. Wang RR, Triulzi DJ, Qu L. Effects of prestorage vs poststorage leukoreduction on the rate of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelets. *Am J Clin Pathol*. 2012; 138(2): 255–259, doi: [10.1309/AJCP5H7EKZTGGBKZ](https://doi.org/10.1309/AJCP5H7EKZTGGBKZ), indexed in Pubmed: [22904138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22904138/).
24. Smoleńska –Sym G., Maślanka K.: Potransfuzyjna ostra niewydolność oddechowa. *Journal of Transfusion Medicine*. 2010; 3(3): 109–111.
25. Peters AL, van Hezel ME, Juffermans NP, et al. Pathogenesis of non-antibody mediated transfusion-related acute lung injury from bench to bedside. *Blood Rev*. 2015; 29(1): 51–61, doi: [10.1016/j.blre.2014.09.007](https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.007), indexed in Pubmed: [25277811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25277811/).
26. Maślanka K, Uhrzynowska M, Łopacz P, et al. Analysis of leucocyte antibodies, cytokines, lysophospholipids and cell microparticles in blood components implicated in post-transfusion reactions with dyspnoea. *Vox Sang*. 2015; 108(1): 27–36, doi: [10.1111/vox.12190](https://doi.org/10.1111/vox.12190), indexed in Pubmed: [25134637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25134637/).
27. Fast LD, Marschner S, DiLeone G, et al. Functional inactivation of human white blood cells in whole blood products using the Mirasol system for whole blood. *Transfusion* 2008, 48 (S2): 169A–170A. (abstract no. SP363).
28. Jackman RP, Heitman JW, Marschner S, et al. Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity after pathogen reduction: mechanisms of action in ultraviolet illumination and riboflavin treatment. *Transfusion*. 2009; 49(12): 2686–2699, doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02333.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02333.x), indexed in Pubmed: [19682337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682337/).
29. Apelseth TO, Hervig TA, Wentzel-Larsen T, et al. Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion*. 2006; 46(5): 800–810, doi: [10.1111/j.1537-2995.2006.00800.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00800.x), indexed in Pubmed: [16686848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16686848/).
30. Reddy M, Eirikis E, Davis C, et al. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*. 2004; 293(1-2): 127–142, doi: [10.1016/j.jim.2004.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006), indexed in Pubmed: [15541283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541283/).
31. Fiebig E, Hirschkorn DF, Maino VC, et al. Assessment of donor T-cell function in cellular blood components by the CD69 induction assay: effects of storage, gamma radiation, and photochemical treatment. *Transfusion*. 2000; 40(7): 761–770, doi: [10.1046/j.1537-2995.2000.40070761.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40070761.x), indexed in Pubmed: [10924602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924602/).

32. Hei DJ, Grass J, Lin L, et al. Elimination of cytokine production in stored platelet concentrate aliquots by photochemical treatment with psoralen plus ultraviolet A light. *Transfusion*. 1999; 39(3): 239–248, doi: [10.1046/j.1537-2995.1999.39399219279.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39399219279.x), indexed in Pubmed: [10204585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10204585/).
33. Muylle L, Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang*. 1994; 66(1): 14–17, doi: [10.1111/j.1423-0410.1994.tb00270.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1994.tb00270.x), indexed in Pubmed: [8146977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8146977/).
34. Lachert E.: *Metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych w krwi i jej składnikach*, Warszawa 2017, ISBN 978-83-947683-0-0.
35. Gravemann U, Pohler P, Lambrecht B, et al. Inactivation of peripheral blood mononuclear cells by UVC light using the Theraflex UV-Platelet system. *Transfus Med Hemother*. 2008; 35(suppl1).