

## PRACA ORYGINALNA

## Fotoinaktywacja jako metoda zwiększająca bezpieczeństwo koncentratów krwinek płytkowych

Fotoinactivation as a method of increasing  
the safety of platelet concentrates

Anna Mazur, Nela Rabenda, Dorota Król, Bożena Drybańska, Stanisław Dyląg

## STRESZCZENIE

Regionalne Centrum Krwiodawstwa  
i Krwiolecznictwa, Katowice

Koncentraty krwinek płytkowych są podstawą w leczeniu nowotworów i chorób hematologicznych oraz w przeszczepianiu komórek macierzystych i narządów litych. Jednakże zakażenia bakteryjne uznawane są za najczęstsze zakażenia pojawiające się z częstością 1 na 2000–3000 donacji przetoczonych koncentratów krwinek płytkowych. Dlatego tak ważnym krokiem wydaje się inaktywacja, która jako metoda chemiczna lub fotochemiczna działa na patogeny wirusowe, bakteryjne i pasożyty, niszcząc je lub blokując możliwość replikacji.

Celem naszych badań była ocena wpływu ryboflawiny – jednej z metod inaktywacji patogenów – na jakość koncentratów krwinek płytkowych (KKP) przy użyciu systemu do inaktywacji patogenów Mirasol PRT (Pathogen Reduction Technology).

Przetwarzanie preparatów płytkowych za pomocą systemu MIRASOL PRT nie spowodowało w nich istotnej różnicy – w porównaniu ze składnikami krwi niepoddanymi redukcji patogenów – w zakresie pH oraz liczby płytek. Wykorzystanie tej metody inaktywacji w krwiolecznictwie może prowadzić do zmniejszenia ryzyka przeniesienia czynników zakaźnych, szczególnie nieoznaczonych w standardowej kwalifikacji do użytku, w składnikach krwi i produktach krwiopochodnych.

## ADRES

## DO KORESPONDENCJI:

Mgr Anna Mazur  
Regionalne Centrum Krwiodawstwa  
i Krwiolecznictwa  
ul. Raciborska 15  
40-074 Katowice  
tel. 32 208 73 40  
e-mail: aniam29@autograf.pl

## SŁOWA KLUCZOWE

koncentraty krwinek płytkowych, inaktywacja, ryboflawina

## ABSTRACT

Platelet concentrates are the basis for treatment of cancer, haematological diseases and transplantation of stem cells and organs. However, bacterial infections are considered the most common infection occurring 1 for 2000–3000 donations of transfused platelet concentrates. Therefore,

it seems to be an important step – an inactivation, which was the method of chemical or photochemical work on viral pathogens, bacterial, parasites in destroying them, or blocking the possibility of replication.

The aim of our study was to evaluate the effect of riboflavin, as one of the methods of pathogen inactivation, the quality of platelet concentrates (KKP) using the system to inactivate pathogens Mirasol PRT (Pathogen Reduction Technology).

Processing with Mirasol PRT system for Platelets preparations did not cause significant difference compared to the blood components are not subjected to pathogen reduction in pH and platelet counts. Using this method, so the hemotherapy inactivation may lead to reduce the risk of transmission of infectious agents, particularly those unmarked in standard qualifications for use in blood components and products.

#### KEY WORDS

platelet concentrates, inactivation, riboflavin

#### WSTĘP

Przetoczenie krwi ratuje życie i wyrównuje niedobory hematologiczne w wielu chorobach. Z transfuzją wiąże się jednak potencjalne ryzyko w postaci powikłań po przetoczeniu składnika krwi, mimo zastosowania wielu metod zapobiegawczych. Wprowadzenie do transfuzji koncentratów krwinek płytkowych (KKP), wpłynęło na zmniejszenie śmiertelności z powodu krwotoków u pacjentów z ostrą białaczką. Obecnie – zastosowanie KKP z pewnością należy do podstawowych metod leczenia chorób hematologicznych czy nowotworów [8]. Bakteryjna kontaminacja krwi i jej składników, zwłaszcza KKP, jest nadal problemem, nawet w krajach rozwijających się. Częściowo jest ona kontrolowana przez doskonalenie praktyki czy unowocześnianie materiałów do poboru i przechowywania składników krwi. Jednak zakażenia bakteryjne uznawane są za najczęstsze infekcje pojawiające się z częstością 1 na 2000–3000 donacji przetoczonych koncentratów krwinek płytkowych [5]. Zdarza się, że zakażenia pacjentów spowodowane transfuzją pojawiają się w rezultacie okienka serologicznego, kiedy to dawca został już zarażony, a jego organizm nie zdążył wytworzyć przeciwciał. Problem ten został jednak zminimalizowany przez zastosowanie testów wykrywających kwasy nukleinowe (NAT) danego patogenu (bakterie, wirusy, pasożyty) [3,8,9]. Do preparatyki składników krwi wprowadzono nowoczesne technologie ograniczające ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych przez transfuzję. Procedury te mają na celu:

- dalsze zmniejszanie okienka serologicznego dla oznaczanych i niebadanych wirusów,
- stworzenie dodatkowej ochrony przeciwko niewykrytym patogenom (wirusy, bakterie, pasożyty),
- zredukowanie ryzyka obecności bakterii,
- możliwe zmniejszenie niepożądanych reakcji poprzetoczeniowych związanych z transfuzją składników krwi.

Początkowo w preparatyce krwi stosowano leukoredukcję, by za pomocą filtrów antyleukocytarnych usunąć przede wszystkim nadmiar leukocytów z danego składnika krwi. Następnie wprowadzono napromieniowanie z wykorzystaniem promieni  $\gamma$  w celu zredukowania ryzyka wystąpienia potransfuzyjnej choroby przeszczep przeciwko biorcy (GvHD) przez zablokowanie proliferacji limfocytów zawartych w przetaczanych składnikach krwi [7,9]. Kolejnym krokiem wydaje się inaktywacja, która jako metoda chemiczna lub fotochemiczna niszczy patogeny wirusowe, bakteryjne i pasożyty lub blokuje możliwość replikacji [2,5,6]. Najbardziej zaawansowaną procedurą w przypadku KKP wydaje się inaktywacja czynników zakaźnych przy użyciu amotosalenu oraz ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) [8]. Ryboflawina jest naturalnie występującym związkami w organizmie człowieka i podstawowym składnikiem odżywczym. Badania przeprowadzone w latach 60. i 70. ubiegłego wieku wykazały, że może ona być skuteczna, jeżeli zastosuje się ją w inaktywacji wirusów i bakterii przy udziale światła widzialnego lub UV, co okazało się przydatne w inaktywacji patogenów w składnikach krwi i produktach krwio pochodnych. Aktywowana pod wpływem

światła ryboflawina utlenia guaninę obecną w kwasach nukleinowych, zapobiegając replikacji genomu patogenu [3,4]. Witamina B<sub>2</sub> nie jest związkami teratogennym ani mutagenym, lecz czynnikiem absorbującym światło widzialne i UV, co zostało wykorzystywane w trakcie preparatyki składnika krwi [7].

Wykorzystanie metod inaktywacji w krwiolecznictwie może prowadzić do zmniejszenia ryzyka przeniesienia czynników zakaźnych, szczególnie nieoznaczonych w standardowej kwalifikacji do użytku, w składnikach krwi i produktach krwiopochodnych.

## CEL

Celem pracy była ocena wpływu procedury inaktywacji patogenów za pomocą ryboflawiny na jakość koncentratów krwinek płytkowych (KKP) przy użyciu systemu do inaktywacji patogenów Mirasol PRT (Pathogen Reduction Technology).

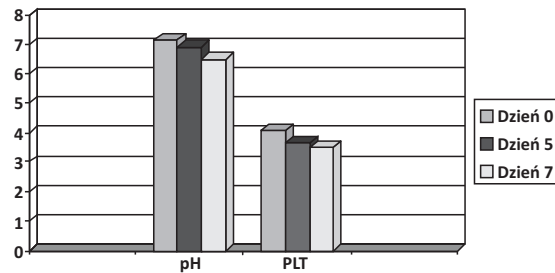
## MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano 18 KKP wyprodukowanych metodą automatyczną przez zlanie pięciu kożuchów leukocytarно-płytkowych uzyskanych z krwi pełnej przy zastosowaniu aparatów Orbisac System firmy CaridianBCT. Do każdego KKP dodawano 35 ml ryboflawiny i naświetlano za pomocą systemu MIRASOL PRT, złożonego z urządzenia do naświetlania – iluminator – i zestawów jednorazowych z ryboflawiną. Wyniki analizowano w dniach 0, 5 i 7, biorąc pod uwagę objętość KKP, jego pH oraz średnią liczbę zawartych w nim krwinek płytkowych. Celem badań było stwierdzenie, w jakim stopniu aktywne terapeutyczne składniki krwi ulegają zmianom funkcjonalnym i metabolicznym w miarę przechowywania.

## WYNIKI

Średnia objętość w 18 KKP poddanych procesowi inaktywacji przy użyciu ryboflawiny wynosiła 357 ml (SD ± 19,4), wartość pH w miarę upływu czasu przechowywania zmniejszała się następująco: 7,14 (SD ±

± 0,076) w dniu zerowym, 6,94 (SD ± 0,14) w dniu piątym, a 6,49 (SD ± 0,3) w dniu siódmym. Liczba krwinek płytkowych również uległa zmniejszeniu od 4,06 × 10<sup>11</sup> na początku badania (SD ± 0,76), poprzez 3,66 × 10<sup>11</sup> w piątym dniu (SD ± 0,77), do 3,51 × 10<sup>11</sup> w ostatnim dniu przechowywania (SD ± 0,76) (ryc. 1).



**Ryc. 1.** Zależność między dniem zerowym, piątym i siódmym w przypadku wartości pH oraz liczby krwinek płytkowych w koncentraty płytkowych poddanych inaktywacji za pomocą ryboflawiny.

**Fig. 1.** The relationship between the day zero, fifth and seventh, in the case of pH values and the number of platelets in platelet concentrates inactivated by riboflavin.

## DYSKUSJA

System MIRASOL przy użyciu ryboflawiny (witaminy B<sub>2</sub>) i światła modyfikuje kwasy nukleinowe czynników chorobotwórczych w składnikach krwi, obniżając poziom patogenów. Z jednej strony kwasy nukleinowe wirusów, bakterii i pasożytów obecnych w składniku krwi absorbują fotony światła o krótkiej długości fali, co skutkuje ich zniszczeniem, a jednocześnie ryboflawina powoduje dodatkowe nieodwracalne zniszczenie kwasów nukleinowych przez chemiczną wymianę elektronów, głównie między ryboflawiną i guaniną. W rezultacie prowadzi to do generacji reaktywnych form tlenu i nieodwracalnego zniszczenia kwasów nukleinowych w różnych reakcjach utleniania [3]. Proces ten ma na celu zminimalizowanie ryzyka przeniesienia wirusów, bakterii i pasożytów na drodze przetoczenia; może on również zmniejszać ryzyko powikłań przetoczeniowych spowodowanych przetoczeniem biorcy leukocytów dawcy.

Technologia inaktywacji ukierunkowana jest na zahamowanie replikacji i transkrypcji kwasów nukleinowych i opiera się na trzech strategiach dotyczących: potencjalnego wpływu metabolitów i fotoproduktów, ich efektyw-

ności skierowanej na większość patogenów oraz wskaźnika redukcji. Jednocześnie należy wziąć pod uwagę krótkofalową i długofalową toksyczność inaktywowanego składnika, bezpieczeństwo personelu oraz to czy redukcja patogenów nie wpłynie na liczbę komórkowych składników krwi [3,9]. Przetwarzanie za pomocą systemu MIRASOL PRT preparatów płytkowych nie powoduje istotnej różnicy w porównaniu ze składnikami krwi nie poddawanymi redukcji patogenów w zakresie pH oraz liczby płytek. Do zalet tego systemu można też zaliczyć fakt, iż ryboflawina jako składnik diety o znanym profilu farmakokinetycznym i toksykologicznym oraz jej fotoprodukty są nietoksyczne i niemutagenne, co wpływa na bezpieczeństwo zarówno pacjenta, jak i personelu przygotowującego dany składnik krwi. Oprócz tego produkt przetwarzany w systemie MIRASOL nie wymaga usuwania ryboflawiny lub jej fotoproduktów przed transfuzją [7,8]. Preparat płytkowy poddany procesowi inaktywacji za pomocą systemu MIRASOL stosuje się u pacjentów wymagających przetoczenia preparatów płytkowych zgodnie z wytycznymi praktyki klinicznej. KKP po inaktywacji można wykorzystać w leczeniu wszelkich postaci małopłytkowości pierwotnej i wtórnej w przebiegu chorób podstawowych lub nabytego urazu. Technologia inaktywacji pato-

genów w systemie MIRASOL może być alternatywą dla naświetlania promieniami gamma w celu zapobiegania związanej z przetoczeniem reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (TA-GVHD). Koncentraty krwinek płytkowych po inaktywacji patogenów za pomocą systemu MIRASOL nie różnią się klinicznie od nieinaktywowanych i należy je przetaczać zgodnie ze standardową praktyką stosowania KKP w krwiolecznictwie.

Wprowadzenie metod inaktywacji szerokiego spektrum czynników zakaźnych w KKP pozwala znacznie podnieść bezpieczeństwo danego składnika krwi, nie wpływając jednocześnie na jego jakość. Wiąże się to np. z eliminacją ryzyka wystąpienia groźnych dla życia reakcji poprzetoczeniowych, a także ze znaczącym zmniejszeniem reakcji alergicznych i lepszą jakością produktu [10]. Ma to duże znaczenie w przypadku czuwania nad bezpieczeństwem składnika krwi i pacjenta pod względem czynników zakaźnych, co nie jest zadaniem prostym i wymaga ciągłej uwagi.

Trzeba pamiętać, że mimo poprawy bezpieczeństwa krwi i składników krwi, badania diagnostyczne powinny być dalej rozwijane, m.in. w kierunku zwiększenia czułości testów. Inaktywacja patogenów w składnikach krwi zmniejsza ryzyko potransfuzyjnych chorób infekcyjnych u biorców [1].

#### PIŚMIENNICTWO

- Allain J.P., Blanco C., Blajchman M.A. i wsp. Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfus. Med. Rev.* 2005; 19(2): 110–126.
- Brecher M.E., Hay S.N. Bacterial contamination of blood components. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 19:5–204.
- Bryant B.J., Klein H.G. Pathogen inactivation. The definitive safeguard for the blood supply. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2007; 131: 719–733.
- Corbin F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. *Int. J. Hematol.* 2002; 76: 253–257.
- Hillyer C.D., Josephson C.D., Blajchman M.A. i wsp. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2003; 575–589.
- Lachert E., Antoniewicz-Papis J. Inaktywacja czynników zakaźnych w produktach krwiopochodnych i składnikach krwi. W: Czynniki zakaźne przenoszone przez krew. Red. E. Brojer. OINPHARMA, Warszawa 2008; 222–238.
- Reddy H.L., Dayan A.D., Cavagnaro J. i wsp. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood inactivation. *Transfus. Med. Rev.* 2008; 22: 133–153.
- Reikvam H., Marschner S., Apelseth T.O. i wsp. The Mirasol® Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. *Blood Transfus.* 2010; 8: 186–192.
- Seghatchian J., de Sousa G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus. Apher. Sci.* 2006; 35: 189–196.
- Solheim B.G. Pathogen reduction of blood components. *Transfus. Apher. Sci.* 2008; 39: 75–82.