



## Efekat inaktivacije patogena primenom riboflavina i ultravioletnog zračenja na kvalitet trombocitnih koncentrata

### Effects of use of riboflavin and ultraviolet light for pathogen inactivation on quality of platelet concentrates

Zoran Stanojković\*, Ana Antić\*, Miodrag Stojanović†

\*Zavod za transfuziju krvi, Niš, Srbija; †Medicinski fakultet, Institut za javno zdravlje, Niš, Srbija

#### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Inaktivacija patogena u krvi i produktima od krvi predstavlja značajan korak u cilju dobijanja bezbedne krvi, što je jedan od prioriteta savremene transfuziološke prakse. Riboflavin (vitamin B2) aktiviran ultravioletnim (UV) zračenjem stvara aktivni kiseonik koji oštećuje ćelijsku membranu i sprečava replikaciju uzročnika bolesti (virusi, bakterije, protozoe) u krvnim komponentama. Cilj ovog rada bio je da se utvrdi uticaj procesa fotoinaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja na biohemijske i funkcionalne karakteristike trombocita dobijenih izdvajanjem iz „buffy coat“ (leukocitno-trombocitnog sloja). **Metode.** Ispitivanje je obuhvatilo 80 koncentrata trombocita izdvojenih iz „buffy coat“, dobijenog separacijom cele krvi dobrovoljnih davalaca krvi unutar šest sati od njenog uzimanja. Koncentrati trombocita su pulirani, pulovi filtrirani, a zatim podeljeni na 10 kontrolnih (K) i 10 ispitivanih (I) jedinica (pulova trombocita). Ispitivane jedinice trombocita tretirane su riboflavinom (35 mL) i UV zračenjem (6,24 J/mL, 265–370 nm) na aparatu Mirasol (Caridian BCT Biotechnologies, USA) u prosečnom trajanju od šest minuta. Kontrolnoj jedinici trombocita dodato je 35 mL fiziološkog rastvora. Uzorci za ispitivanje uzeti su iz kontrolnih i ispitivanih jedinica trombocita inicijalno (K<sub>0</sub> i I<sub>0</sub>), nakon dodavanja fiziološkog rastvora (K<sub>1</sub>), odnosno riboflavina (I<sub>1</sub>), nakon izlaganja UV zračenju (I<sub>2</sub>), prvog dana (K<sub>3</sub> i I<sub>3</sub>) i petog dana skladištenja (K<sub>4</sub> i I<sub>4</sub>). Iz uzoraka su određivani broj i

prinos trombocita, koncentracija rezidualnih eritrocita i leukocita, pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> i bakteriološka ispravnost. **Rezultati.** Sve vrednosti ispitivanih parametara bile su značajno statistički niže u odnosu na vrednosti parametara iz uzorka K<sub>0</sub> i I<sub>0</sub>. Sve vrednosti parametara prvog dana skladištenja trombocita (uzorci K<sub>3</sub> i I<sub>3</sub>) bile su značajno statistički niže u odnosu na vrednosti parametara nakon dodavanja fiziološkog rastvora, odnosno riboflavina (uzorci K<sub>1</sub> i I<sub>1</sub>). Takođe, sve vrednosti analiziranih parametara petog dana skladištenja (uzorci K<sub>4</sub> i I<sub>4</sub>) bile su značajno statistički niže u odnosu na vrednosti parametara iz uzoraka K<sub>1</sub> i K<sub>3</sub>, odnosno I<sub>1</sub> i I<sub>3</sub>. Poređenjem svih analiziranih parametara petog dana ispitivanja (uzorci K<sub>4</sub> i I<sub>4</sub>), nije nađena statistički značajna razlika između kontrolne i eksperimentalne grupe. Svi uzorci trombocita sačuvali su sterilnost do sedmog dana, koliko je praćena bakteriološka ispravnost. **Zaključak.** Trombociti inaktivisani primenom riboflavina i UV zračenja (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) zadržavaju sve karakteristike određene Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope tokom celog perioda skladištenja (pet dana). Rezultati su dosledni podacima prethodnih *in vivo* i *in vitro* ispitivanja i potvrđuju da se trombociti tretirani na ovaj način mogu bezbedno primeniti u rutinskoj transfuziološkoj praksi.

#### Ključne reči:

krv, konzervacija; trombociti; trombociti, broj; vitamin B2; ultravioletni zraci; bakteriologija.

#### Abstract

**Background/Aim.** Pathogen inactivation in blood and blood products is one of the major means to achieve a zero risk blood supply and improve transfusion safety. Riboflavin (vitamin B2) activated by ultraviolet (UV) light, produces active oxygen which damages cell membrane and prevents replication of the carrier of diseases (viruses, bacteria, protozoa) in all blood products. The aim of this study was to establish the influence of the process of pathogens photoinactivation using riboflavin and UV rays on the biochemical and func-

tional characteristics of platelet concentrates prepared from “buffy coat”. **Methods.** The examination included 80 platelet concentrates prepared from “buffy coat”, which was separated from whole blood donated by voluntary blood donors around 6 hours from the moment of collection. Concentrates were pooled, filtered and separated into two groups: one consisted of 10 control units and the other of 10 examined units (pooled platelet concentrates). Examined units of the platelets were treated by riboflavin (35 mL) and UV rays (6.24 J/mL, 265–370 nm) on Mirasol apparatus (Caridian BCT Biotechnologies, USA) in approximate duration of 6 min. A

total of 35 mL of saline solution was added to the control units. The samples for examining were taken from the control and examined units initially ( $K_0$ ,  $I_0$ ), after the addition of saline ( $K_1$ ) and riboflavin ( $I_1$ ), after illumination ( $I_2$ ), first day of storage ( $K_3$ ,  $I_3$ ) and the fifth day of storage ( $K_4$ ,  $I_4$ ). The following parameters were measured: platelet count and platelet yield, residual erythrocyte and leukocyte count, pH,  $pO_2$ ,  $pCO_2$  and bacterial contamination. **Results.** All the measured parameters showed a statistically significant decrease comparing to  $K_0$  and  $I_0$ ; all the results of the first day of platelet storage showed statistically significant decrease comparing to  $K_1$  and  $I_1$ , and all the results of the fifth day of platelet storage ( $K_4$ ,  $I_4$ ) showed a statistically significant decrease comparing to  $K_1$  and  $K_3$  and to  $I_1$  and  $I_3$ . There was no the mentioned difference in the measured parameters

between  $K_4$  and  $I_4$  (the end of storage – the fifth day). All the platelet units were sterile till the seventh day, when the investigation ended. **Conclusion.** Platelet concentrates inactivated by riboflavin and UV rays (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) keep all the characteristics assessed by the Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components (Council of Europe), during the whole storage period (five days). The obtained data were correlated with existing up to date literature and demonstrated that Mirasol treated platelets were safe and could be incorporated effectively in the routine blood bank and transfusion setting.

**Key words:**  
**blood preservation; blood platelets; platelet count; riboflavin; ultraviolet rays; bacteriology.**

## Uvod

Transfuzije koncentrata trombocita sastavni su deo lečenja bolesnika sa trombocitopenijom nastalom zbog smanjene produkcije trombocita usled osnovne bolesti ili primene mijelotoksičnih lekova, potrošnje ili dilucije krvi, ali i nekih stanja povezanih sa disfunkcijom trombocita<sup>1</sup>. Koncentrati trombocita mogu se dobiti separacijom iz jedinica cele krvi dobrovoljnih davalaca ili primenom separatora krvnih ćelija. Koncentrati trombocita iz cele krvi mogu se pripremati iz prethodno prikupljene plazme bogate trombocitima ili izdvajanjem iz *buffy coat* (leukocitno-trombocitnog sloja). Kvalitet pripremljenih koncentrata trombocita zavisi od velikog broja faktora, kao što su: metoda pripreme, dužina skladištenja, vrsta kese u kojoj se čuvaju, a u novije vreme i tehnika inaktivacije patogena<sup>2</sup>.

Standardi koji se odnose na inaktivaciju patogena u krvnim komponentama, posebno u koncentratima trombocita, jedan su od preduslova bezbedne transfuzije. Inaktivacija patogena u krvnim komponentama ima ulogu uklanjanja odnosno inaktivacije svih uzročnika prenosivih bolesti putem krvi (virusi, bakterije, protozoe, prioni). Ona ne zamenjuje testiranje jedinica krvi dobrovoljnih davalaca na markere transfuzijom prenosivih bolesti, ali smanjuje opasnost od „prozor fenomena“ i deluje i na agense za koje testiranje trenutno nije dostupno, a mogu se preneti putem krvi<sup>3,4</sup>. Postupci inaktivacije uzročnika transmisivnih bolesti temelje se na vezivanju raznih supstanci (psoralen, riboflavin, metilensko plavo), kao i delovanju ultravioletnog (UV) i gama zračenja, čime se sprečava replikacija nukleotida DNA i RNA, inhibira proliferacija T-limfocita i prevenira bolest kalema protiv domaćina – *Graft-versus-host-disease* (GVHD), suprimira sinteza citokina i opasnost od pojave posttransfuzionih febrilnih reakcija<sup>5,6</sup>.

Prva metoda inaktivacije patogena koja je ušla u rutinsku transfuziološku praksu u velikom broju evropskih zemalja jeste primena amotosalena u kombinaciji sa UV zračenjem. Danas je najzastupljenija metoda inaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja, koja ima oznaku CE za primenu u plazmi i trombocitima<sup>7</sup>.

Riboflavin (vitamin B2) je prirodno prisutno jedinjenje i esencijalni humani hranljivi sastojak. Izuzetno je efikasan u

inaktivaciji patogena, ako se izloži vidljivom ili UV zračenju, jer stvara aktivne forme kiseonika koje oštećuju ćelijsku membranu, čime se sprečava replikacija uzročnika bolesti u svim produktima krvi<sup>8,9</sup>. Riboflavin je netoksičan, kao i njegovi razgradni produkti, i normalno je prisutan u ljudskom organizmu. On ima planarnu konjugovanu prstenastu strukturu sa lancem šećera koji mu daje hidrosolubilni karakter. Planarni deo molekula umeće se između baza DNA i RNA, a UV zračenje, koje aktivira riboflavin, oksiduje guanin u nukleinskim kiselinama, sprečavajući replikaciju genoma patogena. Riboflavin ne deluje na eritrocite i trombocite, jer te ćelije nemaju jezgro, kao ni na proteine plazme, a ne izdvaja se naknadno iz krvne komponente, jer je normalno prisutan u organizmu i brzo se razgrađuje<sup>10,11</sup>.

Izlaganje koncentrata trombocita mehaničkim i hemijskim agensima može imati štetan uticaj na ćelijski integritet u smislu pojačanja procesa glikolize, aktivacije morfoloških promena i apoptoze u trombocitima, a postoji i opasnost od stvaranja neoantigena i, time, stvaranja iregularnih antitela čije kliničke posledice još uvek nisu poznate<sup>12</sup>.

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi uticaj procesa fotoinaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja na biohemijske karakteristike trombocita dobijenih izdvajanjem iz *buffy coat*.

## Metode

Ispitivanje je obuhvatilo ukupno 80 koncentrata trombocita, prosečne zapremine  $59,80 \pm 7,20$  mL, koji su podvrgnuti procesu inaktivacije na aparatu Mirasol (Mirasol™ Pathogen Reduction Technology System, Caridian BCT Biotechnologies, Lakewood, Colorado, USA) prema unapred utvrđenom protokolu. Koncentrati trombocita dobijeni su izdvajanjem iz *buffy coat*, koji je dobijen separacijom jedinica krvi dobrovoljnih davalaca (prosečne zapremine 450 mL) u roku do šest sati od uzimanja krvi (četvorostruke kese Macopharma CPD/SAGM, Francuska) na automatskom ekstraktoru T-ACE II (Terumo, Japan). Zatim su pulirana po četiri koncentrata trombocita iste krvne grupe (ukupno 20 pulova: A = 8, B = 4, O = 6, AB = 2) i pulovi su ostavljeni 2 sata na tempertauri od oko 22°C bez agitacije. Spojena su po dva

pula trombocita iste krvne grupe (ukupno 10 pulova od po osam koncentrata trombocita: A = 4, B = 2, O = 3, AB = 1), svaki je filtriran (filter za leukoredukciju trombocita – Imugard III-PL, Terumo, Japan), a zatim podeljen na dva pula trombocita jednake zapremine, od kojih je jedna jedinica bila kontrolna (K), a druga ispitivana (I), tretirana Mirasol PRT sistemom (ukupno 10 kontrolnih i 10 ispitivanih pulova trombocita).

Specifikacije trombocita tretiranih Mirasol PRT sistemom podrazumevale su standarde usvojene od proizvođača (Caridian BCT, USA): zapremina produkta 170–360 mL, koncentracija trombocita  $0,8\text{--}2,1 \times 10^6$  ćelija/ $\mu\text{L}$ , koncentracija rezidualnih eritrocita  $\leq 5 \times 10^9$  po  $3,5 \times 10^{11}$  trombocita, koncentracija rezidualnih leukocita  $\leq 250 \times 10^9$  po  $3,5 \times 10^{11}$  trombocita.

Kontrolnoj jedinici dodato je 35 mL fiziološkog rastvora u kesi za skladištenje trombocita (rok skladištenja 5 dana), a ispitivanoj 35 mL 500  $\mu\text{mol/L}$  rastvora riboflavina u originalnoj kesi za iluminaciju (Mirasol *Platelet Illumination/Storage set*), kako bi se postigla finalna koncentracija riboflavina 65–70  $\mu\text{mol/L}$ . Rastvor riboflavina priključen je za kesu za iluminaciju, koja u sebi sadrži trombocite, preko sterilnog konektora (TSCD Terumo, Japan). Ispitivana jedinica potom je postavljena u Mirasol iluminator prema uputstvu proizvođača i podvrgnuta delovanju UV zračenja (6,24 J/mL, 265–370 nm) u prosečnom trajanju od 6 minuta. Obe jedinice (kontrolna i ispitivana) postavljene su horizontalno na agitator (Teknolabo Instruments, Italy) od isteka roka (5 da-

( $K_0$  – inicijalno, odmah nakon formiranja kontrolnog pula, pre dodavanja fiziološkog rastvora,  $K_1$  – posle dodavanja fiziološkog rastvora,  $K_3$  – prvog dana skladištenja,  $K_4$  – petog dana skladištenja). Iz uzoraka su rađene hematološke analize – koncentracija trombocita, rezidualnih eritrocita i leukocita na aparatu Beckman Coulter AcT diff (Beckman Coulter, USA) i gasne analize – pH,  $p\text{O}_2$ ,  $p\text{CO}_2$  na aparatu AVL Compact 3 Blood Gas Analyzer (Roche Diagnostics). Bakteriološka ispravnost trombocita ispitivana je na aparatu BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Francuska), za aerobne bakterije BPA bočice, za anaerobne BPN bočice.

Analizirani parametri prikazani su tabelarno, srednjim vrednostima i standardnim devijacijama. Poređenje ponovljenih merenja unutar jedne grupe (kontrolna grupa –  $K_0$ ,  $K_1$ ,  $K_3$  i  $K_4$ , tj. ispitivana grupa –  $I_0$ ,  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  i  $I_4$ ) vršeno je Studentovim *t*-testom za zavisne uzorke, dok je poređenje parametara između kontrolne i ispitivane grupe vršeno Studentovim *t*-testom za nezavisne uzorke. Statistička značajnost je određivana na nivou  $p < 0,05$ , primenom softverskog paketa SPSS, verzija 18 (SPSS Software GmbH, Germany).

## Rezultati

Prosečna zapremina kontrolnog pula trombocita iznosila je  $272,7 \pm 15,8$  mL, dok je prosečna zapremina ispitivanog pula trombocita iznosila  $278,4 \pm 18,4$  mL. Osnovne karakteristike posmatranih pulova trombocita prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1

Karakteristike pulova trombocita

Red. broj	Broj pula	Masa K (g)	Zapremina K (mL)	Masa I (g)	Zapremina I (mL)
I	J10010903876600	278	263	294	277
II	J10010903866500	305	288	310	293
III	J10010903876700	286	270	294	277
IV	J10010903876800	296	280	307	290
V	J10010903866600	280	265	282	267
VI	J10010903866700	276	261	280	265
VII	J10010903866800	297	280	303	287
VIII	J10010903866900	286	270	289	273
IX	J10010903867000	290	274	292	276
X	J10010903867100	292	276	295	279
$\bar{x}$		288,6	272,7	294,6	278,4

K – kontrolni uzorak (trombociti + 35 mL fiziološkog rastvora);

I – ispitivani uzorak (trombociti + 35 mL riboflavina)

na), uz proveru temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) i zaštitu od okolne svetlosti.

Svi pulovi trombocita, prema Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope<sup>13</sup>, kontrolisani su po utvrđenim parametrima, čime se potvrdio kvalitet proizvoda i osigurala bezbednost i efikasnost transfuzije. Iz ispitivane jedinice uzeto je pet uzoraka –  $I_0$ – $I_4$  ( $I_0$  – inicijalno, odmah nakon formiranja ispitivanog pula, pre dodavanja riboflavina,  $I_1$  – posle dodavanja riboflavina, a pre iluminacije,  $I_2$  – posle završene iluminacije,  $I_3$  – prvog dana skladištenja,  $I_4$  – petog dana skladištenja), a iz kontrolne jedinice uzeta su četiri uzorka –  $K_0$ – $K_1$  i  $K_3$ – $K_4$

Rezultati ispitivanih parametara iz uzoraka kontrolne grupe trombocita prikazani su u tabeli 2.

Poređenjem srednjih vrednosti analiziranih parametara u kontrolnoj grupi uočava se statistički značajno smanjenje vrednosti ovih analiziranih parametara tokom perioda skladištenja. Vrednosti svih parametara bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti parametara iz uzorka  $K_0$ ; sve vrednosti parametara prvog dana skladištenja trombocita (uzorci  $K_3$ ) bile su statistički značajno niže u odnosu na vrednosti parametara nakon dodavanja fiziološkog rastvora (uzorci  $K_1$ ), i sve vrednosti analiziranih parametara petog dana skladištenja (uzorci  $K_4$ ) bile su statistički značajno niže u odnosu

Tabela 2

Analizirani parametri kontrolne grupe				
	K <sub>0</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	K <sub>1</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	K <sub>3</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	K <sub>4</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )
pH	7,17 (0,07)	7,16 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	7,15 $\pm$ 0,06 <sup>A,B</sup>	7,14 $\pm$ 0,04 <sup>A,B,C</sup>
pO <sub>2</sub> (mmHg)	141,69 (11,03)	139,33 $\pm$ 11,43 <sup>A</sup>	133,26 $\pm$ 8,21 <sup>A,B</sup>	125,02 $\pm$ 8,19 <sup>A,B,C</sup>
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	53,46 (2,32)	49,63 $\pm$ 3,70 <sup>A</sup>	33,71 $\pm$ 4,31 <sup>A,B</sup>	25,74 $\pm$ 2,86 <sup>A,B,C</sup>
Broj trombocita ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	1,08 (0,12)	1,06 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	0,99 $\pm$ 0,11 <sup>A,B</sup>	0,93 $\pm$ 0,09 <sup>A,B,C</sup>

<sup>A</sup> -  $p < 0,05$  vs K<sub>0</sub>; <sup>B</sup> -  $p < 0,05$  vs K<sub>1</sub>; <sup>C</sup> -  $p < 0,05$  vs K<sub>1</sub> i K<sub>3</sub>

K<sub>0</sub> – kontrolni uzorak inicijalno; K<sub>1</sub> – kontrolni uzorak posle dodavanja fiziološkog rastvora; K<sub>3</sub> – kontrolni uzorak prvog dana ispitivanja; K<sub>4</sub> – kontrolni uzorak petog dana ispitivanja

na vrednosti parametara iz uzoraka K<sub>1</sub> i K<sub>3</sub>. Inicijalni prinos trombocita kontrolne grupe iznosio je  $2,96 \times 10^{11}$  trombocita, dok je prinos trombocita petog dana skladištenja iznosio  $2,53 \times 10^{11}$  trombocita.

Rezultati ispitivanih parametara iz uzoraka ispitivane grupe trombocita prikazani su u tabeli 3.

koji se mogu preneti putem krvi, ali se za sada ne vrši obavezno testiranje na njihovo prisustvo zbog niske prevalencije u opštoj populaciji, nepoznatog stepena transmisije putem transfuzije krvi ili nedostatka adekvatnog testa za otkrivanje tog infektivnog agensa. To mogu biti virusi (kao što su Flavivirusi Den-1-Den-4, virus St. Louis encefalitisa, Togavirusi

Tabela 3

Analizirani parametri ispitivane grupe					
	I <sub>0</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	I <sub>1</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	I <sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	I <sub>3</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )	I <sub>4</sub> ( $\bar{x} \pm SD$ )
pH	7,17 $\pm$ 0,07	7,17 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	7,16 $\pm$ 0,07 <sup>A,B</sup>	7,15 $\pm$ 0,05 <sup>A,B,C</sup>	7,13 $\pm$ 0,04 <sup>A,B,C,D</sup>
pO <sub>2</sub> (mmHg)	141,39 $\pm$ 9,26	139,20 $\pm$ 8,20 <sup>A</sup>	138,27 $\pm$ 9,16 <sup>A,B</sup>	133,11 $\pm$ 8,38 <sup>A,B,C</sup>	125,54 $\pm$ 8,35 <sup>A,B,C,D</sup>
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	54,00 $\pm$ 2,69	52,94 $\pm$ 3,14	49,11 $\pm$ 3,44 <sup>A,B</sup>	28,28 $\pm$ 5,50 <sup>A,B,C</sup>	22,92 $\pm$ 4,40 <sup>A,B,C,D</sup>
Broj Trombocita ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	1,08 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	1,03 $\pm$ 0,11 <sup>A,B</sup>	0,98 $\pm$ 0,10 <sup>A,B,C</sup>	0,92 $\pm$ 0,10 <sup>A,B,C,D</sup>

<sup>A</sup> -  $p < 0,05$  vs K<sub>0</sub>; <sup>B</sup> -  $p < 0,05$  vs K<sub>1</sub>; <sup>C</sup> -  $p < 0,05$  vs K<sub>1</sub> i K<sub>3</sub>

I<sub>0</sub> – ispitivani uzorak inicijalno; I<sub>1</sub> – ispitivani uzorak posle dodavanja riboflavina; I<sub>2</sub> – ispitivani uzorak nakon UV zračenja; I<sub>3</sub> – ispitivani uzorak prvog dana ispitivanja; I<sub>4</sub> – ispitivani uzorak petog dana ispitivanja

Poređenjem srednjih vrednosti analiziranih parametara ispitivane grupe, takođe, uočava se statistički značajno smanjenje tokom perioda skladištenja trombocita, sa istim odnosom kao i u kontrolnoj grupi, sem kod parcijalnog pritiska CO<sub>2</sub>, gde nema statistički značajnog smanjenja u grupi I<sub>1</sub> u odnosu na I<sub>0</sub>. Inicijalni prinos trombocita ispitivane grupe iznosio je  $3,03 \times 10^{11}$  trombocita, dok je prinos trombocita petog dana skladištenja iznosio  $2,57 \times 10^{11}$  trombocita.

Poređenjem svih analiziranih parametara petog dana ispitivanja (uzorci K<sub>4</sub> i I<sub>4</sub>), ne uočava se statistički signifikantna razlika između kontrolne i ispitivane grupe.

Svi uzorci trombocita sačuvali su sterilnost do sedmog dana, koliko je praćena bakteriološka ispravnost. U uzorcima nije utvrđeno prisustvo rezidualnih leukocita i eritrocita.

## Diskusija

Rizik od virusne i bakterijske transmisije transfuzijom produkata od krvi danas je sveden na minimum u većini evropskih zemalja. U rutinsku transfuziološku praksu uvedeni su osetljivi testovi (anti-HIV 1 i 2, anti-HCV, anti-HBe, anti-HTLV I/II) za testiranje krvi dobrovoljnih davalaca, a poslednjih godina u razvijenim zemljama sveta uvedena je NAT (*nucleic acid-based tests*) metoda, što je značajno snizilo rizik prenošenja ovih virusnih agenasa putem transfuzije produkata od krvi (rizik da se prenese uzročnik bolesti putem transfuzije jedinice krvi iznosi 1/1,9 miliona za HIV, 1/1,6 miliona za HCV)<sup>14,15</sup>. Poseban problem u savremenoj transfuziološkoj praksi, međutim, predstavljaju patogeni agensi

si zapadnog i istočnog konjskog encefalitisa, Chikungunuya, respiratorni *Corona* virusi, *Circovirus* TT i SEN, *Deltavirus* Hepatitis D, Epstein-Barrov virus, humani herpes virusi 6, 7 i 8, Parvovirus B19), protozoe (*Babesia microti*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*), bakterije – gram pozitivne i gram negativne (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borelia burgdoferi*) ili prioni (izazivaju Creutzfeldt-Jakobovu bolest)<sup>16-18</sup>. Svemu navedenom treba dodati i činjenicu da se svake dve do tri godine pojavljuju novi virusi koji se mogu preneti transfuzijama produkata krvi. S druge strane, koncentracije trombocita pokazuju posebno povećan rizik od bakterijske kontaminacije, s obzirom na uslove skladištenja (temperatura od  $22 \pm 2$  °C). Prema savremenim ispitivanjima, minimum bakterijske kontaminacije trombocita posle pet dana čuvanja na sobnoj temperaturi je oko  $10^7/\text{mL}$ <sup>19</sup>.

Inaktivacija patogena u produktima od krvi predstavlja dodatni nivo zaštite, kako od poznatih infektivnih agenasa, tako i od onih koji još uvek nisu prepoznati kao moguća pretnja globalnom snabdevanju krvlju<sup>14</sup>. Danas se koriste različite fizičke i hemijske metode inaktivacije patogena, koje zadovoljavaju osnovne propisane kriterijume: redukcija incidencije virusne, bakterijske i parazitarne transmisije transfuzijom produkata od krvi na najmanji mogući nivo, široka efikasnost u smislu prevencije transfuzijom uzrokovane epidemije novog štetnog patogena, laka implementacija u postojeću organizaciju transfuziološke službe, minimalna toksičnost, nepromenjena klinička efikasnost inaktivisanih produ-

kata od krvi, niska cena<sup>7, 15, 20</sup>. U ovom ispitivanju korišćena je metoda dodavanja riboflavina puliranom koncentratu trombocita i naknadno izlaganje produkta UV zračenju sa obe strane. Kao posledica aktivacije riboflavina pod dejstvom UV zraka dolazi do oksidacije guanina u nukleinskim kiselinama i njihovog ireverzibilnog oštećenja, što sprečava dalju replikaciju patogena. Mnogobrojne studije do sada pokazale su da ova metoda efikasno inaktivira intraćelijski i za ćeliju vezani virus humane imunodeficijencije – HIV (4,46 i 5,93 log<sub>10</sub>/mL, respektivno), virus zapadnog Nila (5,19 log<sub>10</sub>/ml), virus Parvo B19 (> 6,5 log<sub>10</sub>/mL), virus vezikularnog stomatitisa (> 5,3 log<sub>10</sub>/mL), *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* (5–6 log<sub>10</sub>/mL), *Escherichia coli* (> 4 log<sub>10</sub>/mL), *Leishmania donovani infantum* (5–6 log<sub>10</sub>/mL), a dokazano je i da prevenira infekciju prouzrokovanu bakterijama *Klebsiella pneumoniae* i *Bacillus cere*<sup>17, 21–23</sup>.

Kvalitet koncentrata trombocita prema usvojenim standardima određuje se na osnovu praćenja određenih parametara: koncentracija i prinos trombocita, pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, koncentracija laktata, potrošnja glukoze, ekspresija GMP-140. Dosadašnja ispitivanja funkcije tretiranih trombocita *in vitro* pokazuju da ne postoji značajna promena u prinosu trombocita nakon primene riboflavina i UV zračenja. Morfologija trombocita je dobro očuvana, ali trombociti pokazuju povećanu aktivaciju i ćelijski metabolizam, sa povećanjem potrošnje, odnosno smanjenjem koncentracije glukoze, povećanjem produkcije laktata, blagim padom pH, pojavom mikropartikula i povećanjem ekspresije P-selektina tokom perioda skladištenja<sup>19, 24</sup>. Ove promene su identične u tretiranim pojedinačnim koncentratima trombocita, tretiranim puliranim koncentratima i tretiranim afereznim koncentratima trombocita<sup>25, 26</sup>. Ovo ispitivanje pokazalo je da primena riboflavina i UV zračenja ne dovodi do promene broja trombocita, pH, pO<sub>2</sub> i pCO<sub>2</sub> u tretiranim puliranim koncentratima trombocita, kao i da se taj kvalitet zadržava i posle pet dana skladištenja trombocita.

Najnovija ispitivanja pokazala su da su promene opisane u literaturi daleko manje izražene, ako se umesto u plazmi, trombociti resuspenduju u mešavini od 35% plazme i 65% aditivne solucije za trombocite (PAS – *platelet additive*

*solution*)<sup>24, 27</sup>. Trombociti koriste glukozu kao glavni izvor energije za stvaranje adenozin-trifosfata (ATP) kroz proces aerobne oksidativne fosforilacije korišćenjem piruvata ili kroz proces anaerobne glikolize. Oksidativna fosforilacija zahteva adekvatnu mitohondrijalnu i enzimsku aktivnost i strukturni integritet<sup>28</sup>. Picker i sar.<sup>29</sup> u najnovijim ispitivanjima pokazali su da primena riboflavina i UV zračenja ne menja mitohondrijalnu dehidrogenaznu aktivnost, odnosno da trombociti ostaju funkcionalni i metabolički aktivni. Potrošnja glukoze direktno korelira sa koncentracijom laktata u tretiranim koncentratima trombocita. Goodrich<sup>8</sup> i Goodrich i sar.<sup>30</sup> u brojnim *in vivo* ispitivanjima pokazali su da povećanje koncentracije laktata najviše korelira sa oporavkom trombocita, a vrednost pH, koja je praćena i u ovom ispitivanju, sa njihovim preživljavanjem.

Dosadašnja ispitivanja pokazala su, takođe, da su bolesnici koji su primili transfuzije trombocita inaktivisanih primenom riboflavina i UV zračenja imali uporedive hemostatske i hematološke parametre nakon transfuzije trombocita sa bolesnicima koji su primili transfuzije netretiranih kontrolnih koncentrata trombocita<sup>19, 25, 31</sup>. Takođe, nisu zabeležene neželjene reakcije nakon transfuzije u ovoj grupi bolesnika. Neželjene reakcije davaoca protiv primaoca, kao što je transfuzijom uzrokovana bolest „kalem protiv domaćina“ (TAGVHD) nastaju kao posledica prisustva rezidualnih leukocita u proizvodima krvi<sup>5, 14</sup>. U transfuziološkoj praksi ulažu se veliki naponi da se takve reakcije inhibiraju, a to uključuje leukoredukciju i izlaganje proizvoda krvi UV zračenju, što je upravo deo tehnike inaktivacije.

### Zaključak

Trombociti inaktivisani primenom riboflavina i UV zračenja (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) zadržavaju sve karakteristike određene Preporukama za pripremu, upotrebu i obezbeđenje kvaliteta komponenata krvi Saveta Evrope, tokom celog perioda skladištenja (pet dana). Rezultati su dosledni podacima prethodnih *in vivo* i *in vitro* ispitivanja i potvrđuju da se trombociti tretirani na ovaj način mogu bezbedno primeniti u rutinskoj transfuziološkoj praksi.

### L I T E R A T U R A

- Balint B, Paunović D, Stanojković Z. Hemotherapy for patients with hemostatic disorders. In: Balint B, editor. Transfusiology. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 331–8. (Serbian)
- Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion. Transfus Med Rev 2007; 21(4): 295–306.
- Solheim BG. Pathogen reduction of blood components. Transf Apheres Sci 2008; 39(1): 75–82.
- Klein HG, Bryant BJ. Pathogen-reduction methods: advantages and limits. Vox Sang 2009; 4(1): 154–60.
- Klein HG, Anderson D, Bernardi MJ, Cable R, Carey W, Hoch JS, et al. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. Transfusion 2007; 47(12): 2338–47.
- McCullough J. Pathogen inactivation: a new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections. Am J Clin Pathol 2007; 128(6): 945–55.
- Corbin F 3rd. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. Int J Hematol 2002; 76(Suppl 2): 253–7.
- Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. Vox Sang 2000; 78(Suppl 2): 211–5.
- Goodrich RP, Edrich RA. The antiviral and antibacterial properties of riboflavin and light: applications to blood safety and transfusion medicine. In: Silva E, Edwards AM, editors. Comprehensive series in photochemistry and photobiology. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 2006.
- Kumar V, Lockertie O, Keil SD, Ruane PH, Platę MS, Martin CB, et al. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. Photochem Photobiol 2004; 80(1): 15–21.
- Zhenling H, Yuwen M, Qin W, Xun Q, Kaibeng Q. Inactivation of lymphocytes in blood products using riboflavin photochemical

- treatment with visible light. *Photochem Photobiol* 2008; 84(5): 1195–200.
12. *Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, Beckers EA, Leebeek FW, Sonneveld P*, et al. Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion* 2004; 44(3): 313–9.
  13. *Council of Europe*. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Belgium, Brussels: European Directorate for the Quality of medicines, Recommendations No. R(95)15. 2008.
  14. *Luban NL*. Transfusion safety: Where are we today? *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054: 325–41.
  15. *Mc Cullough J*. Pathogen inactivation of platelets. *Transf Alt Transf Med* 2006; 2: 121–6.
  16. *Irshad M, Joshi YK, Sharma Y, Dhar I*. Transfusion transmitted virus: a review on its molecular characteristics and role in medicine. *World J Gastroenterol* 2006; 12(32): 5122–34.
  17. *Ruane PH, Edrich R, Gamp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP*. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004; 44(6): 877–85.
  18. *Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, Brecher ME, Busch M, Leiby D*, et al. Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfus Med Rev* 2005; 19(2): 110–26.
  19. *Goodrich RP, Li J, Pieters H, Crookes R, Roodt J, Heyns Adu P*. Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox Sang* 2006; 90(4): 279–85.
  20. *Goodrich RP, Roberts T, Folléa G*. Clinical evaluation of Mirasol PRT treated apheresis platelets in thrombocytopenic patients. *Transfusion* 2008; 48: 20A.
  21. *Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J*. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006; 35(1): 5–17.
  22. *Fast LD, Dileone G, Li J, Goodrich R*. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 2006; 46(4): 642–8.
  23. *Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W*, et al. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sang* 2006; 90(2): 85–91.
  24. *Seghatchian J, de Sousa G*. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006; 35(3): 189–96.
  25. *AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J*, et al. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion* 2005; 45(8): 1335–41.
  26. *Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Galan AM*, et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion* 2005; 45(6): 911–9.
  27. *Janetzko K, Hinze K, Marschner S, Goodrich R, Klüter H*. Pathogen reduction technology (Mirasol) treated single-donor platelets resuspended in a mixture of autologous plasma and PAS. *Vox Sang* 2009; 97(3): 234–9.
  28. *Vučetić D, Balint B, Taseski J, Mandić-Radić S, Regović V*. Biochemical changes in thrombocyte concentrates stored for 5 days. *Vojnosanit Pregl* 2000; 57(5): 29–36. (Serbian)
  29. *Picker SM, Steisel A, Gathof BS*. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study. *Transfus Apher Sci* 2009; 40(2): 79–85.
  30. *Goodrich RP, Janssen M, Ghielli M, Li J, Leow S, Edrich R*, et al. Correlation of in vitro parameters and in vivo recovery and survival values for PRT treated platelets in normal human donors. *Transfusion* 2003; 43: 79A–80A.
  31. *Janetzko K, Hinze K, Marschner S, Goodrich R, Klüter H*. Evaluation of Different Preparation Procedures of Pathogen Reduction Technology (Mirasol®)-Treated Platelets Collected by Plateletpheresis. *Transfus Med Hemother* 2009; 36(5): 309–15.
- Primljen 11. XII 2009.  
Revidiran 18. I 2010.  
Prihvaćen 26. I 2010.