



Inaktivacija patogena u zamrznutoj svežoj plazmi primenom riboflavina i ultravioletnog zračenja: uticaj na koncentraciju proteina i faktor VIII koagulacije

Pathogen inactivation in fresh frozen plasma using riboflavin and ultraviolet light: effects on plasma proteins and coagulation factor VIII

Zoran Stanojković, Ana Antić

Zavod za transfuziju krvi, Niš, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. 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 koncentraciju faktora koagulacije VIII:C (FVIII:C) i proteina u plazmi koja se tretira pre zamrzavanja. **Metode.** Ispitivanjem je obuhvaćeno 20 jedinica plazme, dobijenih separacijom cele krvi dobrovoljnih davalaca krvi tokom šest sati od kolekcije, koje su pulirane, a zatim podeljene na 10 kontrolnih i 10 eksperimentalnih jedinica. Eksperimentalne jedinice plazme 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 plazmi (KG) dodato je 35 mL fiziološkog rastvora. Uzorci za ispitivanje uzeti su iz KG i iz eksperimentalne plazme nakon dodavanja riboflavina pre (EG1) ili posle iluminacije (EG2). **Rezultati.** Poređenjem srednjih vrednosti FVIII:C (%) uočeno je statistički značajno viši nivo FVIII:C u grupi EG1 u odnosu na grupu EG2 ($65,00 \pm 4,52$ vs $63,20 \pm 4,73$; $t = 4,323$, $p = 0,002$), dok između KG i grupe EG1 i EG2 nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji FVIII:C. Primenjena procedura nije dovela do promene koncentracije proteina u plazmi. Koncentracija albumina (g/L) bila je statistički značajno smanjena u grupi EG2 u odnosu na KG ($33,35 \pm 0,94$ vs $31,94 \pm 0,84$; $t = 3,534$, $p = 0,002$), ali bez statistički značajne razlike u koncentraciji albumina između KG i EG1, kao i između EG1 i EG2. **Zaključak.** Plazma inaktivisana primenom riboflavina i UV zračenja (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) zadržava sve karakteristike konvencionalne plazme, te se može koristiti u terapiji patoloških stanja koja zahtevaju transfuziju zamrznute sveže plazme ili kod bolesnika sa trombotičnom trombocitopenijskom purpurom kojima se sprovodi terapijska izmena plazme.

Ključne reči:

plazma; virusi, inaktivacija; ultravioletni zraci; vitamin B2; faktor VIII; lečenje.

Abstract

Background/Aim. 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 photo inactivation in pathogens using riboflavin and UV rays on the concentration of coagulation factor VIII:C (FVIII:C) and proteins in plasma that were treated before freezing. **Methods.** The examination included 20 units of plasma, separated from whole blood donated by voluntary blood donors around 6 hours from the moment of collection. The units were pooled and separated in to two groups: one consisted of 10 control units and the other of 10 experimental units. Experimental units of the plasma 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 minutes. Furthermore, 35 mL of saline solution was added to the control plasma. One sample for examining was taken from the control plasma (KG) and two residual were taken from experimental plasma after the addition of riboflavin either before (EG1) or post illumination (EG2). **Results.** Comparing the mean values of FVIII:C (%) we noticed statistically significantly higher level in the EG1 group than in the EG2 group (65.00 ± 4.52 vs 63.20 ± 4.73 ; $t = 4.323$, $p = 0.002$), while between the KG and experimental groups (EG1 and EG2) there was no statistically significant difference in the concentration of FVIII:C. There was a statistically significant decrease of albumin concentration (g/L) in the EG2 group comparing to the KG (33.35 ± 0.94 vs 31.94 ± 0.84 ; $t = 3.534$, $p = 0.002$), but there was no mentioned difference in albumin concentration between the KG and the EG1, so as between the EG1 and the EG2. **Conclusion.** Plasma inactivated by riboflavin and UV rays (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) keeps all the characteristics of conventional plasma, so it could be used for the treatment of pathological conditions that demand transfusion of fresh frozen plasma, or in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura when we use therapeutic exchange of plasma.

Key words:

plasma; virus inactivation; ultraviolet rays; riboflavin; factor VIII; therapeutics.

Uvod

Transfuzija krvi i produkata od krvi predstavlja značajan vid lečenja bolesnika sa teškim hemobiološkim poremećajima. Osnovni cilj transfuzije je održavanje homeostaze u organizmu, a ona se postiže održavanjem volumena krvi, vezivanjem i transportom kiseonika i održavanjem funkcija koagulacije.

Uprkos pozitivnom terapijskom efektu, transfuzija može biti udružena sa brojnim neželjenim efektima, zbog čega njena primena nije bez rizika po zdravlje bolesnika¹. Jedna od najznačajnijih opasnosti transfuzijskog suportivnog lečenja još uvek je mogućnost infekcije uzročnicima bolesti koji se mogu preneti putem krvi (virusi, bakterije, protozoe i prioni). Pojava transfuzijom prenetog sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) 80-tih godina i uticaj ovog virusa na hiljade bolesnika koji su primali krv, posebno obolelih od hemofilije lečenih produktima proizvedenim iz pulova plazme dobrovoljnih davalaca krvi, promenilo je stavove o bezbednoj krvi u celom svetu². U rutinsku transfuziološku praksu uvedeni su osetljiviji testovi: *anti-human immunodeficiency virus (HIV) 1 i 2*, *anti-hepatitis C virus (HCV)*, *antibodies to hepatitis core antigen (anti-HBc)*, *antibody to human T-cell lymphotropic virus (anti-HTLV I/II)*³, a poslednjih godina u razvijenim zemljama sveta uvedeno je NAT (*Nucleic Acid based Tests*) testiranje krvi dobrovoljnih davalaca, što je značajno smanjilo rizik od prenošenja ovih virusnih agenasa putem transfuzije produkata krvi (rizik da se prenese uzročnik bolesti putem transfuzije jedinice zamrznute sveže plazme iznosi 1/10 000 000 za HIV, 1/50 000 000 za HCV, 1/1 200 000 za hepatitis B virus – HBV)⁴. Poseban problem u transfuzijskom lečenju jesu bakterijske infekcije i paraziti kao što su uzročnici malarije, Chagas-ove bolesti i dr, kao i činjenica da se svake dve do tri godine pojavljuju novi virusi koji se mogu preneti transfuzijama produkata od krvi^{4,5}.

Inaktivacija patogena u produktima od krvi jeste trend savremene transfuziološke prakse i ima ulogu uklanjanja, odnosno inaktivacije svih prenosivih uzročnika bolesti putem krvi. Ona ne zamenjuje testiranje jedinica krvi dobrovoljnih davalaca na markere bolesti prenosivih transfuzijom, ali smanjuje opasnost „prozor fenomena“ i grešaka pri testiranju i deluje na agense koji nisu uključeni u rutinsko testiranje^{6,7}. 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 dezoksiribonukleinske kiseline (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA), inhibira proliferacija T limfocita i sprečava reakcija protiv primaoca (*Graft versus Host Disease – GVHD*), te suprimira sinteza citokina i opasnost od pojave posttransfuzijskih febrilnih reakcija^{8,9}.

Riboflavin (vitamin B2) je jedinjenje prisutno svuda u prirodi i esencijalni humani hranljivi sastojak. Izuzetno je efikasan u inaktivaciji patogena, ako se izloži vidljivom ili UV zračenju. Naime, aktiviran UV zračenjem stvara aktivne forme kiseonika koje oštećuju ćelijsku membranu, posledičnim sprečavanjem replikacije uzročnika bolesti u svim produktima od krvi¹⁰. I riboflavin i njegovi razgradni produkti

su netoksični i normalno prisutni u ljudskom organizmu. Riboflavin je planarne konjugovane prstenaste strukture 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, a ne deluje ni na proteine plazme, ne izdvaja se naknadno iz krvne komponente, jer je normalno prisutan u organizmu i brzo se razgrađuje^{11,12}.

Mogući štetni efekti postupka inaktivacije jesu smanjenje hemostatskog delovanja zbog smanjene aktivnosti faktora koagulacije, što povećava potreban broj transfundovanih produkata od krvi, kao i opasnost od stvaranja neoantigena i time stvaranja iregularnih antitela čije kliničke posledice još uvek nisu poznate¹³.

Cilj ovog rada bio je utvrđivanje uticaja procesa fotoinaktivacije patogena primenom riboflavina i UV zračenja na koncentraciju faktora koagulacije VIII:C (FVIII:C) i proteina u plazmi podvrgnutoj ovom tretmanu pre zamrzavanja.

Metode

Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno ukupno 20 jedinica plazme, prosečne zapremine 230 ± 20 mL, podvrgnutih procesu inaktivacije na aparatu Mirasol (Mirasol™ Pathogen Reduction Technology System, Caridian BCT Biotechnologies, Lakewood, Colorado, USA) prema unapred utvrđenom protokolu. Jedinice plazme bile su dobijene separacijom jedinica krvi dobrovoljnih davalaca krvnih grupa A, B, O i AB (prosečne zapremine 450 mL) u intervalu od 6 sati od kolekcije krvi (četvorostruke kese Macopharma CPD/SAG, Francuska). Pulirane su po dve jedinice plazme iste krvne grupe (10 pulova: A = 4, B = 2, O = 3, AB = 1). Svaki pojedinačni pul izmeren je i podeljen na dve jedinice jednake zapremine, od kojih je jedna jedinica bila kontrolna, a druga eksperimentalna, tretirana Mirasol PRT sistemom.

Specifikacije jedinica plazme tretirane Mirasol PRT sistemom podrazumevale su standarde usvojene od proizvođača (Caridian BCT, USA): zapremina produkta 170–360 mL, koncentracija trombocita $\leq 2,1 \times 10^6$ ćelija/ μ L, koncentracija rezidualnih eritrocita $\leq 15 \times 10^9$ eritrocita/L, koncentracija rezidualnih leukocita $\leq 1 \times 10^9$ leukocita/L.

Kontrolnoj jedinici (KG) dodato je 35 mL fiziološkog rastvora u univerzalnoj kesi za krv, pogodnoj za čuvanje plazme, a eksperimentalnoj jedinici 35 mL 500 μ mol/L rastvora riboflavina u originalnoj kesi za iluminaciju (Mirasol Plasma Illumination/Storage set), kako bi se postigla finalna koncentracija riboflavina od 60 μ mol/L. Rastvor riboflavina konektovan je za kesu za iluminaciju, koja je u sebi sadržavala plazmu, preko sterilnog konektora (TSCD Terumo). Eksperimentalna jedinica potom je postavljena u Mirasol iluminator prema uputstvu proizvođača i podvrgavana delovanju UV zračenja (6,24 J/mL, 265–370 nm) u prosečnom trajanju od 6 minuta.

Iz eksperimentalne jedinice uzimana su dva uzorka posle dodavanja riboflavina, a pre iluminacije (grupa EG1) i posle završene iluminacije (grupa EG2), a iz KG uziman je

jedan uzorak, i to posle dodavanja fiziološkog rastvora. Svi uzorci su zamrzavani na temperaturi $< -40\text{ }^{\circ}\text{C}$ u roku od 6 h od završetka separacije. Iz uzoraka plazme koja je naknadno bila otapana na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ određivana je koncentracija FVIII:C (%) koagulacijskom metodom (referentne vrednosti: 50–150%) na aparatu ACL 7000 IL (Instrumentation Laboratory, USA), a koncentracija ukupnih proteina (g/L) i albumina (g/L) na aparatu Olympus AU 680 (Olympus, Japan).

Analizirani parametri prikazani su tabelarno i grafički, uz srednju vrednost i standardnu devijaciju. Poređenje srednjih vrednosti kontrolne grupe i dve eksperimentalne grupe (pre i posle iluminacije) vršeno je Studentovim *t*-testom za nezavisne uzorke. Poređenje analiziranih parametara eksperimentalnih grupa (uzorci EG1 i EG2) vršeno je Studentovim *t*-testom za zavisne uzorke. Statistička značajnost utvrđivana je na nivou $p < 0,05$ primenom softverskog paketa SPSS (SPSS Software GmbH, Germany, verzija 15).

Rezultati

Prosečna zapremina pula, dobijenog spajanjem dve inicijalne jedinice plazme, iznosila je $450,50 \pm 15,50\text{ mL}$. Prosečna zapremina kontrolne jedinice plazme iznosila je $257,50 \pm 18,50\text{ mL}$, a eksperimentalne jedinice $262,50 \pm 15,50\text{ mL}$. Osnovne karakteristike ispitivanih jedinica plazme prikazane su u tabeli 1.

Koncentracija FVIII:C (%) u kontrolnoj grupi iznosila je $67,60 \pm 4,88$, u eksperimentalnoj grupi EG1 koja je tretirana riboflavinom iznosila je $65,00 \pm 4,52$, a u grupi EG2 koja je tretirana riboflavinom i UV zračenjem $63,20 \pm 4,73$ (tabela 2).

Poređenjem srednjih vrednosti FVIII:C uočava se statistički značajno viši nivo FVIII:C u grupi EG1 nego u grupi EG2 ($65,00 \pm 4,52$ vs $63,20 \pm 4,73$; $t = 4,323$, $p = 0,002$), dok između KG i grupa EG1 i EG2 nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji FVIII:C.

Tabela 1

Karakteristike ispitivanih jedinica plazmi

Redni broj	Broj produkta (pul)	Inicijalne komponente	Zapremina pula (mL)	Masa KJ (g)	Zapremina KJ (mL)	Masa EJ (g)	Zapremina EJ (mL)
I	J10010903672200	J10010901172200 J10010901149600	450	261	255	272	265
II	J10010903672300	J1001090984500 J1001090897200	465	272	265	277	270
III	J10010903672400	J10010901148100 J10010901171900	455	267	260	272	265
IV	J10010903672500	J10010901048600 J10010901146600	445	260	255	262	260
V	J10010903672600	J10010901049000 J10010901146500	450	260	255	272	265
VI	J10010903672700	J10010901049100 J10010901171800	440	261	255	262	255
VII	J10010903672800	J10010901050700 J10010901159600	440	256	250	260	260
VIII	J10010903672900	J10010901159400 J10010901144800	455	260	255	263	255
IX	J10010903673000	J10010901051200 J10010901051300	460	270	265	272	265
X	J10010903674000	J10010901158600 J10010901148900	445	268	260	270	265
\bar{x}			450,5	263,5	257,5	268,1	262,5

KJ – kontrolna jedinica (plazma + 35 mL fiziološkog rastvora); EJ – eksperimentalna jedinica (plazma + 35 mL riboflavina)

Tabela 2

Koncentracija FVIII:C u ispitivanim uzorcima

Uzorci (redni broj)	KG (%)	EG1 (%)	EG2 (%)
I	69	66	62
II	57	56	54
III	66	62	60
IV	68	68	65
V	65	64	64
VI	74	70	69
VII	64	60	59
VIII	71	67	65
IX	70	67	64
X	72	70	70
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$67,60 \pm 4,88$	$65,00 \pm 4,52$	$63,20 \pm 4,73$

KG – kontrolni uzorak plazme kojoj je dodato 35 mL fiziološkog rastvora, EG – uzorak eksperimentalne plazme kojoj je dodan riboflavin, uzet pre (EG1) ili posle ultravioletnog zračenja (EG2)

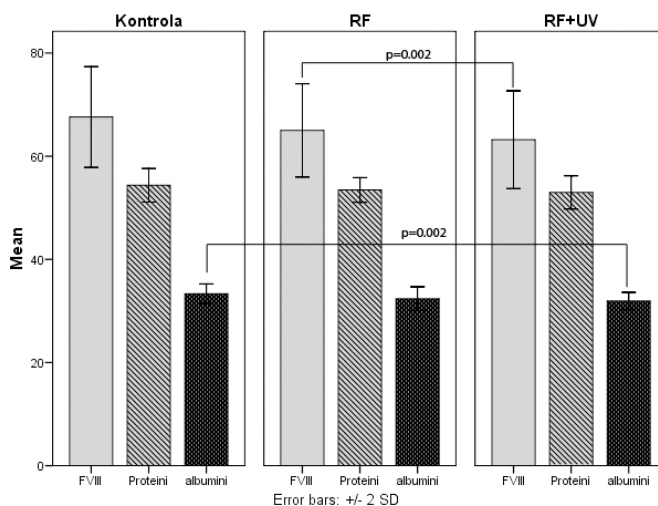
Koncentracija proteina (g/L), određivana u uzorcima kontrolne plazme i plazme koja je bila podvrgnuta procesu inaktivacije, prikazana je u tabeli 3.

Poređenje srednjih vrednosti koncentracije proteina pokazalo je da ne postoji statistički značajna razlika između kontrolne i eksperimentalnih grupa, odnosno da proces inaktivacije patogena u plazmi primenom riboflavina i fotoiluminacije nije doveo do promene koncentracije proteina u plazmi.

Koncentracija albumina, određena u ispitivanim uzorcima, prikazana je u tabeli 4.

Analiza dobijenih rezultata pokazala je da je koncentracija albumina bila najviša u kontrolnoj grupi, i to statistički značajno u odnosu na koncentraciju albumina u uzorcima plazme grupe EG2 ($33,35 \pm 0,94$ vs $31,94 \pm 0,84$; $t = 3,534$, $p = 0,002$). S druge strane, nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji albumina između KG i EG1, niti između grupa EG1 i EG2.

Svi parametri analizirani Studentovim t -testom prikazani su na slici 1.



Sl. 1 – Srednje vrednosti analiziranih parametara (t -test)

RF – riboflavin; UV – ultravioletno zračenje

Koncentracija proteina u ispitivanim uzorcima

Tabela 3

Uzorci (redni broj)	KG (%)	EG1 (%)	EG2 (%)
I	55,90	54,00	54,90
II	53,50	51,20	50,90
III	54,50	53,20	52,30
IV	54,20	51,70	50,70
V	54,40	53,10	52,40
VI	54,50	54,70	52,70
VII	56,40	54,50	53,00
VIII	50,40	54,00	55,40
IX	54,70	53,70	52,70
X	55,20	54,50	54,80
$\bar{x} \pm SD$	$54,37 \pm 1,63$	$53,46 \pm 1,19$	$52,98 \pm 1,61$

KG – kontrolni uzorak plazme kojoj je dodato 35 mL fiziološkog rastvora, EG – uzorak eksperimentalne plazme kojoj je dodat riboflavin, uzet pre (EG1) ili posle ultravioletnog zračenja (EG2)

Koncentracija albumina u ispitivanim uzorcima

Tabela 4

Uzorci (redni broj)	KG (%)	EG1 (%)	EG2 (%)
I	33,70	33,70	32,70
II	31,90	30,70	30,50
III	32,90	31,90	31,20
IV	34,10	32,60	32,20
V	34,30	33,20	32,90
VI	33,10	32,70	31,70
VII	34,60	33,70	32,00
VIII	31,80	30,30	31,00
IX	33,50	32,20	32,20
X	33,60	32,80	33,00
$\bar{x} \pm SD$	$33,35 \pm 0,94$	$32,38 \pm 1,15$	$31,94 \pm 0,84$

KG – kontrolni uzorak plazme kojoj je dodato 35 mL fiziološkog rastvora, EG – uzorak eksperimentalne plazme kojoj je dodat riboflavin, uzet pre (EG1) ili posle ultravioletnog zračenja (EG2)

Diskusija

Inaktivacija patogena u krvi i produktima od krvi predstavlja značajan korak u obezbeđenju bezbedne krvi, što je jedan od prioriteta savremene transfuziološke prakse. Ona predstavlja dodatni nivo zaštite, kako od poznatih infektivnih agenasa, tako i od agenasa koji još uvek nisu prepoznati kao moguća pretnja globalnom snabdevanju krvlju^{5,14}. U savremenoj literaturi navode se mnogobrojni patogeni koji se mogu preneti putem krvi, ali, za sada, ne vrši se obavezno *screening* 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 zapadnog i istočnog konjskog encefalitisa, *Chikungunyua*, respiratorni *Corona* virusi, *Circovirus* TT i SEN, *Deltavirus Hepatitis* D, Epstein-Barr-ov 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-Jakob-ovu bolest)¹⁵⁻¹⁷.

Prvi podaci o inaktivaciji patogena u plazmi potiču iz 1946. godine, a podrazumevali su nekoliko koraka precipitacije i fizičke separacije centrifugiranjem ili filtracijom precipitata uz promenu pH sredine, temperature, jonske jačine i koncentracije etanola^{6,7}. Danas su dostupne različite fizičke i hemijske metode inaktivacije patogena u plazmi¹⁸, a u ovom ispitivanju korišćena je metoda dodavanja riboflavina jedinici plazme 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 pokazale su da ova metoda ima široko antimikrobno dejstvo i da dovodi do redukcije infektivnog potencijala virusa zapadnog Nila, virusa Parvo B19, da sprečava infekciju izazvanu bakterijama *Staphylococcus epidermidis* i *Escherichia coli* i da dovodi do 5-6log redukcije *Leishmania donovani infantum*^{19,20}.

Zamrznuta sveža plazma koja se dobija separacijom cele krvi sadrži različite organske i neorganske molekule, ali se, u prvom redu, koristi u terapiji stečenih koagulopatija, posebno onih kod kojih istovremeno postoji nizak nivo više faktora koagulacije, kada nije dostupan izolovani koncentrat pojedinačnog faktora (npr. faktor V ili faktor XI) ili u sklopu terapijskih izmena plazme kod bolesnika sa trombotičnom trombocitopenijskom purpurom (TTP)²¹. Plazma koja se koristi za lečenje ne samo da mora biti bezbedna (bez virusa, bakterija i protozoa), već mora biti i klinički efikasna, odnosno sadržati dovoljnu koncentraciju faktora koagulacije i svih odgovarajućih proteina.

Većina dosadašnjih studija vezanih za uticaj procesa inaktivacije na koagulacionu aktivnost u plazmi odnosi se na aktivnost FVIII, s obzirom na to da je on najmanje stabilan

od svih proteina u plazmi^{22,23}. S druge strane, FVIII je reaktant akutne faze i njegova koncentracija u plazmi u mnogobrojnim patološkim stanjima najčešće je abnormalna ili povećana, čak i u nekoliko slučajeva složenih koagulopatija.

Ovo ispitivanje pokazalo je da nema statistički značajnog sniženja koagulacione aktivnosti FVIII u inaktiviranoj plazmi, kao i to da su čak određene koncentracije FVIII:C u tretiranoj plazmi pokazale više vrednosti od koncentracija FVIII saopštenih u prethodnim studijama²²⁻²⁴. To znači da plazma dobijena separacijom cele krvi u intervalu od šest sati nakon kolekcije, podvrgnuta fotoinaktivaciji (riboflavin +UV zračenje) u roku od 2 do 22 sata od separacije, a potom zamrznuta na temperaturi nižoj od -30 °C tokom 24 sata, pokazuje dobro očuvanu prokoagulantnu aktivnost. Buytaert-Hoefen i sar.²⁵ pokazali su da je aktivnost faktora posebno dobro očuvana ako se plazma zamrzne tokom osam sati nakon kolekcije krvi (koncentracija faktora VIII viša za 15%, faktora V za 12%, faktora XI za 23%). Bihm²⁶ je ispitivanje vršio i sa jedinicama plazme koje su bile zamrznute na temperaturi nižoj od -30 °C 52 nedelje, a zatim su bile otopljene i podvrgnute procesu inaktivacije na aparatu Mirasol. Izmerna koncentracija FVIII (hromogena metoda) bila je 0,9 U/mL ± 0,2 U/mL (referentne vrednosti 0,45 U/mL – 1,68 U/mL).

Poređenjem aktivnosti FVIII:C u ovom ispitivanju i rezultata koji su saopšteni u literaturi, a odnose se na inaktivaciju patogena u plazmi drugim metodama (npr. primenom metilenskog plavog – MB), ne nalazi se značajna razlika (za MB-FVIII 0,71 U/mL, očuvano 80% aktivnosti)²⁷.

Takođe, ovo ispitivanje pokazalo je da primena riboflavina i UV zračenja ne utiče na ukupne proteine u plazmi jer ne dovodi do promene njihove koncentracije, ali da postoji statistički značajno smanjenje koncentracije albumina. Podaci iz literature slični su podacima iz ovog ispitivanja i ukazuju na to da inaktivacija patogena u plazmi, kako primenom riboflavina i UV zračenja, tako i primenom MB, amotosalena i psoralena najviše utiče na koncentraciju albumina i fibrinogena, uz pad koagulacijske aktivnosti FVIII^{22, 23, 28, 29}.

Opsežnija ispitivanja Larrea i sar.^{23, 30} o uticaju riboflavina i UV zračenja na koncentraciju antikoagulantnih proteina u plazmi, pokazuju održavanje nivoa proteina C, α -2 antiplazmina, antitrombina III i posebno proteina S, čija se koncentracija primenom drugih metoda inaktivacije patogena značajno smanjuje, te bi primena tako inaktivirane plazme u većem volumenu mogla predisponirati razvoj venskog tromboembolizma.

Zaključak

Plazma inaktivirana primenom riboflavina i UV zračenja (Mirasol PRT sistem, Caridian BCT, USA) zadržava sve karakteristike konvencionalne plazme, pa se može koristiti u terapiji urođenih i stečenih koagulopatija koje zahtevaju transfuziju zamrznute sveže plazme ili kod bolesnika sa trombotičnom trombocitopenijskom purpurom kojima se sprovodi terapijska izmena plazme.

L I T E R A T U R A

1. *Luban NL*. Transfusion safety: where are we today? *Ann NY Acad Sci* 2005; 1054: 325–41.
2. *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.
3. *Council of Europe*. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 14th ed. Recommendations No. R(95)15. Belgium, Brussels: European Directorate for the Quality of medicines; 2008.
4. *Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV*. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003; 43(9): 1322–9.
5. *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.
6. *Solheim BG*. Pathogen reduction of blood components. *Transfus Apher Sci* 2008; 39(1): 75–82.
7. *Klein HG, Bryant BJ*. Pathogen-reduction methods: advantages and limits. *Vox Sang* 2009; 4: 154–60.
8. *Klein HG, Anderson D, Bernardi MJ, Cable R, Carey W, Hoch JS*, et al. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. Report of a consensus conference. *Transfusion* 2007; 47(12): 2338–47.
9. *Hervig T*. Where will pathogen inactivation have the greatest impact? *Vox Sang* 2007; 2(1): 25–9.
10. *Goodrich RP*. The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang* 2000; 78(Suppl 2): 211–5.
11. *Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz 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: 15–21.
12. *Cui Z, Huang Y, Mo Q, Wang X, Qian K*. Inactivation of lymphocytes in blood products using riboflavin photochemical treatment with visible light. *Photochem Photobiol* 2008; 84(5): 1195–200.
13. *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.
14. *McCullough J*. Pathogen inactivation: a new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections. *Am J Clin Pathol* 2007; 128(6): 945–55.
15. *Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz Mde F*. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitol Res* 2006; 98(6): 519–24.
16. *Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW*, et al. Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. *Transfusion* 2006; 46(10): 1737–44.
17. *Svae TE, Neisser-Svae A, Bailey A, Reichl H, Biesert L, Schmidt T*, et al. Prion safety of transfusion plasma and plasma-derivatives typically used for prophylactic treatment. *Transfus Apher Sci* 2008; 39(1): 59–67.
18. *Foster PR*. Removal of TSE agents from blood products. *Vox Sang* 2004; 87(Suppl 2): 7–10.
19. *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.
20. *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.
21. *Balint B*. Therapeutic use of blood components. In: *Balint B, Trkaljić M*, editors. The basics of transfusion medicine. Belgrade: Čigoja štampa; 2003. p. 132–299.
22. *Hornsey VS, Drummond O, Morrison A, McMillan L, MacGregor IR, Prowse CV*. Pathogen reduction of fresh plasma using riboflavin and ultraviolet light: effects on plasma coagulation proteins. *Transfusion* 2009; 49(10): 2167–72.
23. *Larrea L, Calabuig M, Roldán V, Rivera J, Tsai HM, Vicente V*, et al. The influence of riboflavin photochemistry on plasma coagulation factors. *Transfus Apher Sci* 2009; 41(3): 199–204.
24. *Osselaer JC, Debry C, Goffaux M, Pineau J, Calomme G, Dubuc E*, et al. Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and amotosalen. *Transfusion* 2008; 48(1): 108–17.
25. *Buytaert-Hoefen K, Gampg D, Edrich R, Hendrix B, Goodrich R*. Mirasol pathogen treated frozen plasma maintains protein quality. *Transfusion* 2007; 47(3S): SP88.
26. *Bibm D*. Protein quality of previously frozen plasma treated with the mirasol pathogen inactivation process and stored for two years. *Vox Sang* 2009; 96(Suppl): 375–6.
27. *Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, Hornsey VS, Turner CP, Young D*, et al. The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2003; 43(9): 1238–47.
28. *Smith J, Rock G*. Protein quality in Mirasol pathogen reduction technology-treated, apheresis-derived fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2010; 50(4): 926–31.
29. *De Valensart N, Rapaille A, Goossenaerts E, Sondag-Thull D, Deneys V*. Study of coagulation function in thawed apheresis plasma for photochemical treatment by amotosalen and UVA. *Vox Sang* 2009; 96(3): 213–8.
30. *Prowse C*. Properties of pathogen-inactivated plasma components. *Transfus Med Rev* 2009; 23(2): 124–33.

Primljen 9. XI 2009.
 Revidiran 11. VI 2010.
 Prihvaćen 15. VI 2010.