

# REAKCIJA TRANSPLANTATA PROTIV PRIMATELJA UZROKOVANA TRANSFUZIJOM

## TRANSFUSION-ASSOCIATED GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE

INES BOJANIĆ, BRANKA GOLUBIĆ ČEPULIĆ\*

**Deskriptori:** Transfuzija krvi – neželjeni učinci; Reakcija transplantata protiv primatelja – etiologija

**Sažetak.** Reakcija transplantata protiv primatelja uzrokovana transfuzijom (TA-GVHD) rijetka je, ali u pravilu fatalna komplikacija transfuzije krvnog pripravka koji sadržava vijabilne T-limfocite. TA-GVHD manifestira se kao akutni sindrom karakteriziran poremećajem funkcije kože, jetre, gastrointestinalnog trakta i koštane srži. Zbog aplazije koštane srži nastaje pancitopenija praćena krvarenjem i infekcijom, a većina bolesnika umire mjesec dana nakon transfuzije. Rizik od pojave TA-GVHD-a ovisi o broju i vijabilnosti limfocita u krvnom pripravku, funkciji imunskog sustava primatelja i stupnju nepodudarnosti antigena histokompatibilnosti između primatelja i davatelja. Rizik je najveći u imunodeficientnih i imunosupriminiranih primatelja transfuzije krvi. Liječenje TA-GVHD-a za sada je u pravilu neučinkovito, pa je osobito važna prevencija bolesti. Rizične skupine bolesnika moraju biti identificirane i liječene isključivo s ozračenim staničnim krvnim pripravcima, budući da gama-zračenje inhibira proliferaciju limfocita davatelja i za sada je jedina učinkovita metoda prevencije TA-GVHD-a.

**Descriptors:** Blood transfusion – adverse effects; Graft vs host disease – etiologija

**Summary.** Transfusion-associated graft-versus-host disease (TA-GVHD) is rare but usually fatal complication of transfusion of any blood component containing viable T lymphocytes. TA-GVHD manifests as an acute syndrome characterized by the dysfunction of the skin, liver, gastrointestinal tract and bone marrow. The development of bone marrow aplasia increases the risk for hemorrhage and infection and most patients die within 1 month of transfusion. The risk associated with an individual transfusion depends on the number and viability of contaminated lymphocytes, the susceptibility of the patient's immune system to their engraftment and the degree of disparity in histocompatibility antigens between the donor and the patient. The risk of TA-GVHD are highest in recipients with immunodeficiency or immunosuppression. Prevention of TA-GVHD is of great importance as it cannot be treated successfully. Patients at risk must be identified and transfused with irradiated cellular blood products, as gamma irradiation inhibits the proliferation of donor lymphocytes and is currently the only recommended method for TA-GVHD prevention.

Liječ Vjesn 2004;126:39–47

Dobro je poznato da se u eritrocitnim i trombocitnim krvnim pripravcima nalaze leukociti koji u primatelja mogu izazvati i dalekosežne biološke posljedice. Transfundirani leukociti sudjeluju u nastanku febrilnih transfuzijskih reakcija, aloimunizacije i refrakternosti na transfuzije trombocita, u prijenosu citomegalovirusa i drugih uzročnika bolesti prenosivih krvlju te modulaciji i supresiji imunskog sustava primatelja. Manje je poznato da se nakon transfuzije krvnih pripravaka koji sadržavaju vijabilne leukocite može javiti i reakcija transplantata protiv primatelja (engl. graft-vs-host disease, GVHD). Ova je reakcija česta komplikacija transplantacije alogene koštane srži, a nastaje zbog presađivanja i proliferacije davatelja limfocita koji oštećuju tkiva primatelja, što se klinički očituje porastom temperature, karakterističnim kožnim osipom, proljevom i oštećenjem jetre. Reakcija transplantata protiv primatelja uzrokovana transfuzijom (engl. transfusion associated graft-vs-host disease, TA-GVHD) rijetka je, ali izuzetno teška komplikacija transfuzijskog liječenja. Iako su kliničke manifestacije GVHD-a nakon transfuzije krvi slične kao i nakon transplantacije koštane srži, u TA-GVHD-u uvijek se javlja teška aplazija koštane srži pa bolest ima fulminantan tijek i u pravilu dovodi do smrti bolesnika. Budući da za sada nema učinkovitog liječenja TA-GVHD-a, izuzetno je važna identifikacija rizičnih skupina bolesnika i primjena preventivnih mjera.

### Povijesni prikaz

Reakcija transplantata protiv primatelja, koja nastaje kao posljedica presađivanja imunokompetentnih T-limfocita davatelja u primatelja čiji ih imunski sustav nije sposoban odbaciti, prvi put se spominje još pedesetih godina prošlog stoljeća. Billingham je u miševa opisao bolest krzljanja (engl. runt disease) koja nastaje nakon injekcije stanica alogene slezene ili

koštane srži u novorođene miševe. U miševa su se javila oštećenja kože, proljev, slabljenje i naposljetku su ugibali. Ovaj sindrom objašnjen je kao posljedica reakcije transplantiranih stanica slezene i koštane srži protiv stanica primatelja.<sup>1</sup> Prvi put je o reakciji transplantata protiv primatelja u ljudi izvješteno 1959. godine. Mathe je izvjestio o pojavi »sekundarnog sindroma« kod bolesnika nakon transplantacije alogene koštane srži.<sup>2</sup> Simptomi koji su se javili bili su slični kao u miševa s bolesti krzljanja, od osipa kože, proljeva, poremećene funkcije jetre do letalnog ishoda. GVHD je od tada prepoznata kao česta komplikacija transplantacije alogene koštane srži.

Shimoda je 1955. opisao stanje koje je nazvao postoperativna eritrodermija (POE), što se smatra prvim izvještajem o TA-GVHD-u, budući da se danas zna da su POE i TA-GVHD ista bolest.<sup>3</sup> On je opisao 12 bolesnika kod kojih su se između 6 i 13 dana nakon kirurškog zahvata javili osip i visoka temperatura, a bolesnici su unatoč primijenjenom simptomatskom liječenju umrli. Svi bolesnici primili su svježu krv prije i nakon zahvata, što je u to vrijeme bila uobičajena praksa. Sličan sindrom opisan je 1965. u dvoje djece s kongenitalnom imunodeficijencijom. Jedno je dijete liječeno koncentratima granulocita, a drugo eksangvino-transfuzijom svježe krvi.<sup>4</sup> U oba djeteta ubrzo se javio osip, hepatomegalija i pancitopenija, a nakon kratkog vremena nastupila je smrt. Klinička slika odgovarala je bolesti krzljanja viđenoj u eksperimentalnih životinja, kao i »sekundarnom sindromu« nakon transplantacije koštane srži.

\* Zavod za kliničku transfuziologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a, Zagreb (mr. sc. Ines Bojanić, dr. med.; mr. sc. Branka Golubić Čepulić, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. I. Bojanić, Zavod za kliničku transfuziologiju, KBC Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb

Primljeno 25. rujna 2003., prihvaćeno 30. listopada 2003.

TA-GVHD je sedamdesetih godina izdvojen kao zaseban entitet, prvo u imunokompromitiranih, a kasnije i u imunokompetentnih primatelja transfuzije krvi. Prvi potvrđen slučaj TA-GVHD-a u imunokompetentnih primatelja objavljen je 1984. u Japanu u bolesnika koji je nakon kardiokirurške operacije dobio povišenu temperaturu, osip, proljev i pancitopeniju te naposljetku umro.<sup>5</sup> Klinički i patohistološki nalazi upućivali su na GVHD, što je i potvrdio nalaz stanica s HLA-antigenima davatelja u krvi primatelja.<sup>6</sup>

Do danas je u literaturi japanskog i engleskoga govornog područja objavljeno više od 200 izvještaja o TA-GVHD-u, većinom pojedinačnih slučajeva ili o malim skupinama bolesnika. Broj objavljenih slučajeva TA-GVHD-a nedvojbeno je manji od stvarnog broja zbog čestog neprepoznavanja ovog stanja i nedostatka definitivnoga dijagnostičkog dokaza.

### Patogeneza

U patogenezi TA-GVHD-a sudjeluje više čimbenika. Billingham je definirao tri glavna uvjeta koji moraju biti ispunjeni za nastanak GVHD-a:

1. transplantat mora sadržavati imunokompetentne stanice sposobne za diobu,
2. mora postojati razlika između HLA-antigena davatelja i primatelja tako da davateljeve stanice primatelja prepoznaju kao stranog
3. primatelj mora biti nesposoban odbaciti transplantirane imunokompetentne stanice.<sup>1</sup>

U svakodnevnom transfuzijskom liječenju prva su dva zah-tejva uvijek ispunjena, a varijabilan je jedino imunوسي status primatelja.

U svim staničnim krvnim pripravcima nalaze se T-limfociti koji su odgovorni za nastanak GVHD-a. Za nastanak bolesti važan je broj transfundiranih T-limfocita, a najmanji broj vijabilnih limfocita nuždan za izazivanje TA-GVHD-a varira ovisno o imunوسي statusu primatelja, kao i o stupnju antigen-ske nepodudarnosti davatelja i primatelja. Istraživanja na životinjama pokazala su da je za izazivanje GVHD-a nakon transplantacije koštane srži potrebna minimalna doza od  $1 \times 10^7$  limfocita po kilogramu tjelesne težine primatelja (kg TT), a pretpostavlja se da je slična doza potrebna i za izazivanje GVHD-a u ljudi.<sup>7</sup> U djece s teškom kombiniranom imunodeficijencijom objavljeni su slučajevi fatalnog TA-GVHD-a nakon transfuzije samo  $8 \times 10^4$  limfocita/kg TT.

Kod imunokompetentnih primatelja imunوسي sustav obično uspješno eliminira transfundirane davatelje T-limfocite. Međutim, kod primatelja s prirođenom ili stečenom imunodeficijencijom zbog intenzivnog citostatskog liječenja i radioterapije, imunوسي sustav ne može odbaciti davateljeve T-limfocite, koji proliferiraju i izazivaju reakciju transplantata protiv primatelja.

Rjeđe TA-GVHD može nastati i u imunokompetentnih primatelja koji zbog tolerancije davateljevih stanica nisu sposobni učinkovito imunوسي reakcijom odbaciti presadak.<sup>8</sup> Tolerancija nastaje kada davatelj i primatelj imaju zajedničke antigene HLA-sustava tako da je primatelj heterozigot, a davatelj homozigot za zajednički haplotip, tzv. jednosmjerna HLA-podudarnost (engl. one-way HLA match). Imunokompetentni HLA-heterozigotni primatelj tada ne prepoznaje kao strane transfundirane stanice davatelja i ne može ih odbaciti. Istodobno transfundirani T-limfociti davatelja prepoznaju drugi haplotip na primateljevima stanicama kao strani, što uzrokuje njihovu proliferaciju.<sup>9</sup> TA-GVHD koji nastaje u ovim okolnostima može se očekivati bez obzira na primateljev imunوسي sustav, jer je neuspjeh eliminacije davateljevih limfocita posljedica nepovoljne kombinacije podudarnosti antigena HLA-sustava davatelja i primatelja, a ne imunokompetencije primatelja.<sup>9</sup>

Lee i sur. istraživali su kinetiku uklanjanja limfocita davatelja iz cirkulacije imunokompetentnih primatelja.<sup>10</sup> Tijekom prvog i drugog dana nakon transfuzije uklanja se većina (99,9%) leukocita davatelja, zatim trećeg do petog dana raste broj leukocita davatelja u cirkulaciji i napokon petog do sedmog dana dolazi do sekundarnog uklanjanja davateljevih stanica. Pretpostavili su da je porast broja leukocita davatelja u cirkulaciji posljedica reakcije transplantata na primatelja, a sekundarno uklanjanje leukocita reakcija odbacivanja transplantata. Ako je primatelj imunodeficijentan ili ne može odbaciti transfundirane stanice zbog jednosmjerne HLA-podudarnosti, leukociti nastavljaju nekontrolirano proliferirati i uzrokuju TA-GVHD.

Imunosna reakcija odgovorna za nastanak TA-GVHD-a je složena, a osnovni mehanizam nastanka je isti kao u GVHD-u nakon transplantacije koštane srži. Nastanak akutnoga GVHD-a nakon transplantacije koštane srži može se podijeliti u tri osnovne faze: u prvoj fazi tijekom pripreme za transplantaciju dolazi do pojačanog stvaranja citokina, što stvara uvjete za dodatnu aktivaciju T-limfocita davatelja, u drugoj, tzv. aferentnoj fazi, dolazi do aktivacije i ekspanzije T-limfocita davatelja i u trećoj, tzv. eferentnoj fazi davateljeve izvršne stanice oštećuju tkivo primatelja.<sup>11</sup>

Tijekom pripreme za transplantaciju zbog primjene intenzivne kemoterapije i/ili zračenja dolazi do oštećenja tkiva i aktivacije stanica domaćina koje počnu proizvoditi upalne citokine. Upalni citokini, kao što su faktor tumorske nekroze (engl. tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) i interleukin 1 (IL-1), pojačavaju ekspresiju antigena MHC i drugih athezijskih molekula (ICAM-1, VCAM-1), što dovodi do pojačanog prepoznavanja primateljevih MHC-antigena od strane transfundiranih aloreaktivnih davateljevih T-limfocita.

Aferentna faza sastoji se od tri dijela: prezentacije antigena koji aktiviraju T-limfocite, njihove proliferacije te diferencijacije aktiviranih T-limfocita u stanice koje djeluju citotoksično ili izlučuju citokine. Eferentna faza primarno je posredovana citokinima koji napadaju tkivo domaćina bilo direktno bilo angažiranjem drugih stanica kao što su NK-stanice, makrofazi ili T-limfociti, što na kraju uzrokuje smrt stanice i oštećenje tkiva domaćina.<sup>12</sup> Ciljni alomorfi HLA izraženi su u svim tkivima primatelja zbog čega se GVHD očituje postupnom disfunkcijom i zatajenjem mnogih organskih sustava.<sup>13</sup>

T-limfociti koji sudjeluju u nastanku TA-GVHD-a primarno reagiraju prema funkcijskom obrascu tipa Th1 i izlučuju citokine IL-2 i IFN- $\gamma$  te započinje imunوسي odgovor posredovan stanicama. IL-2 i IFN- $\gamma$  uzrokuju daljnju ekspanziju T-limfocita, aktiviraju različite izvršne stanice, kao što su citotoksični T-limfociti (CTLs), prirodne stanice ubojice (engl. natural killer cells, NK-stanice), koje će diferencirati u LAK-stanice i makrofage. Aktivirani makrofazi dodatno izlučuju citokine TNF- $\alpha$  i IL-1 i na taj se način stvara samopojačavajući mehanizam povratne sprege, što na kraju dovodi do kliničke manifestacije GVHD-a.<sup>11</sup>

TNF- $\alpha$  i IL-1 odgovorni su za neke kliničke manifestacije GVHD-a jer je dokazano da mogu uzrokovati anoreksiju i gubitak težine.<sup>13,14</sup> Aktivirani makrofazi uz citokine proizvode i velike količine dušikova oksida koji doprinosi oštećenju ciljnih tkiva tijekom GVHD-a. Dušikov oksid ima direktan citotoksični učinak na jetru i smatra se da je važan u manifestaciji GVHD-a na gastrointestinalnom sustavu.

Nishimura je ispitivao subpopulacije T-limfocita davatelja koji uzrokuju TA-GVHD.<sup>15</sup> Iz krvi bolesnika kod kojega se javio TA-GVHD nakon transfuzije svježih koncentrata trombocita pripremljenih iz krvi njegove kćeri i sina izdvojeni su i analizirani klonovi T-limfocita. Analizom polimorfizma mikrosatelitnih lokusa DNA i HLA tipiziranjem dokazano je da su TA-GVHD izazvali limfociti sina/davatelja, koji je bio homo-

zigot za HLA-antigene za koje je otac/primatelj bio heterozigot. Identificirana su tri tipa T-limfocita davatelja: tip I je CD8+ citotoksični klon; tip II je CD4+ citotoksični klon i tip III ne-citotoksični CD4+ klon koji na stimulaciju izlučuje TNF- $\beta$ . Ovi rezultati pokazuju da u nastanku TA-GVHD-a CD8+ i CD4+ T-limfociti sudjeluju bilo direktnom citotoksičnosti bilo sekrecijom citotoksičnih citokina, što potvrđuje da su faze nastanka GVHD-a nakon transfuzije istovrsne kao i nakon transplantacije koštane srži.

### Rizični faktori

O rizičnim faktorima za nastanak TA-GVHD-a najviše se saznalo analizom osobina bolesnika i njihova liječenja u dokazanim slučajevima TA-GVHD-a. Jedan od glavnih rizičnih faktora nastanka TA-GVHD-a jesu prirođena ili stečena stanja imunodeficijencije. Oštećenja imunostnog sustava česta su u hospitaliziranih bolesnika, bilo zbog osnovne bolesti bilo kao rezultat liječenja kemoterapijom, steroidima ili zračenjem. Uz to sama transfuzija krvi može modulirati i suprimirati imunostni odgovor primatelja. Rizik od nastanka TA-GVHD-a ovisi o tipu imunostne deficijencije i najveći je kod oštećenja imunosti posredovane stanicama. Deficijencije humoralne imunosti, stečene ili prirođene hipogamaglobulinemije, bez obzira na težinu, nisu rizični faktor za nastanak TA-GVHD. Za nastanak TA-GVHD-a rizične su sljedeće okolnosti:

1. primatelj s oštećenim sustavom stanične imunosti u kojih se transfundirani limfociti mogu uspješno presaditi i proliferirati,
2. primateljeva stanična imunost je nerazvijena ili je djelomično oštećena te nije sposoban eliminirati velik broj transfundiranih limfocita
3. primateljev imunostni sustav je normalan, ali zbog tkivne sličnosti između davatelja i primatelja, davatelj ne može prepoznati transfundirane limfocite kao strane.

Analiza da sada objavljenih slučajeva pokazala je da je najveća incidencija TA-GVHD-a u Japanu. Ohto i Anderson su analizirali slučajeve TA-GVHD-a u Japanu s ciljem identifikacije dodatnih rizičnih faktora.<sup>16</sup> S obzirom na osnovnu bolest 122 slučaja su podijelili u tri skupine: 1. bolesnike liječene kardiokirurškim zahvatom, 2. bolesnike sa solidnim tumorima liječene samo operativno i 3. ostale bolesnike liječene transfuzijom krvi zbog različitih bolesti. U sve tri skupine klinička je slika bila ista, nije bilo razlike u medijanu broja dana od transfuzije do početka bolesti, a i krajnji je ishod bio sličan, jer su samo dva bolesnika iz sve tri skupine preživjela. U 30 bolesnika kod kojih je HLA-tipiziranjem potvrđena dijagnoza TA-GVHD-a, davatelj i primatelj su imali najmanje jedan zajednički haplotip. Čak 28 (93%) davatelja bili su HLA-homozigoti za zajednički haplotip, a u polovici slučajeva bila je riječ o A24 B52 haplotipu koji ima visoku incidenciju (9,2%) u japanskoj populaciji. Genska homogenost japanske populacije uzrok je značajno povećanog rizika od pojave TA-GVHD-a. Rizik od nastanka TA-GVHD-a zbog homozigotnog HLA-haplotipa različit je između etničkih skupina i kod primjene krvnih pripravaka od nesrodnih davatelja u bijelaca u SAD-u je u raponu od 1:17 700 do 1:39 000, u Nijemaca 1:6900 do 1:48 500, a u Japanaca 1:1160 do 7900. S primjenom krvi srodnih davatelja rizik raste u bijelaca u SAD-u do 21 put, za Nijemce 18 puta i 11 puta za Japance.<sup>17</sup>

Na višu prevalenciju TA-GVHD-a u Japanu vjerojatno utječe i česta primjena svježe krvi srodnih davatelja, što nije praksa u drugim zemljama. U Sjevernoj Americi se na primjer gotovo isključivo rabi krv iz zalaha, a samo je manje od 2% bolesnika liječeno krvnim pripravcima srodnih davatelja.<sup>18</sup> U pre-

gledu japanskih slučajeva 62% bolesnika s TA-GVHD-om primilo je krv koja nije bila starija od 3 dana.<sup>16</sup> Petz je analizom TA-GVHD-a zabilježenih u SAD-u također pokazao da je 90% slučajeva TA-GVHD-a izazvala transfuzija krvi koja nije bila starija od 4 dana.<sup>19</sup> Istraživanja promjena leukocita u krvnom pripravku tijekom pohrane razjasnila su zašto starost krvnog pripravka utječe na rizik od nastanka TA-GVHD-a. Leukociti iz eritrocitnog pripravka nakon 2 tjedna pohrane više se ne mogu stimulirati niti reagirati u miješanoj kulturi limfocita (engl. mixed leucocyte culture, MLC) te progresivno dolazi do njihove apoptoze.<sup>20</sup> Daljnje istraživanje je pokazalo da leukociti već trećeg dana pohrane slabije reagiraju, a petog dana više uopće ne reagiraju u MLC-u.<sup>21</sup> Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da se primjena »svježe krvi« može smatrati dodatnim rizikom za pojavu TA-GVHD-a.

### Krvni pripravci koji uzrokuju TA-GVHD

Svi stanični krvni pripravci koji sadržavaju vijabilne T-limfocite sudjelovali su u nastanku objavljenih slučajeva TA-GVHD-a.<sup>11</sup> Sindrom je opisan nakon transfuzije pune krvi, koncentrata eritrocita, trombocita, granulocita pa čak i svježe nezamrznute plazme. Do danas nisu objavljeni slučajevi TA-GVHD-a uzrokovani transfuzijom svježe zamrznute plazme (SZP) ili krioprecipitata. Iako nakon odmrzavanja u pripravku SZP-a preostaje malen broj vijabilnih limfocita, smatra se da do sada nije objavljen ni jedan slučaj TA-GVHD-a izazvan SZP-om jer je broj preostalih stanica nakon otapanja ispod praga potrebnog za izazivanje bolesti.<sup>22</sup>

Već je spomenuto da na rizik od pojave TA-GVHD-a utječe i starost krvnih pripravaka. Rizik je veći za eritrocitne krvne pripravke starosti do 7 dana. Za ostale stanične pripravke, s obzirom na njihov kratki rok valjanosti (koncentrati trombocita 5 dana i koncentrati granulocita 24 sata) rizik je prisutan tijekom cijelog vremena pohrane.<sup>21</sup> Transfuzije granulocita najčešće izazivaju TA-GVHD, što je razumljivo budući da se ovi pripravci moraju transfundirati svježi, sadržavaju velik broj limfocita i obično se primjenjuju u neutropeničnih i imunosuprimiranih bolesnika.<sup>23</sup>

Za nastanak TA-GVHD-a rizične su i transfuzije podudarnih trombocita nesrodnog HLA-homozigotnog davatelja koje primatelj ne prepoznaje kao strane.<sup>24</sup>

### Klinička slika

Klinička slika TA-GVHD-a slična je kliničkoj slici GVHD-a nakon transplantacije koštane srži, osim što se bolest javlja ranije, uz obaveznu aplaziju koštane srži te fulminantni tijek bolesti.<sup>11</sup>

TA-GVHD manifestira se kao akutni sindrom koji se obično javlja 4 do 30 dana nakon transfuzije krvi, a karakteriziran je poremećajem funkcija kože, jetre, gastrointestinalnog trakta i koštane srži. Prva klinička manifestacija obično je visoka temperatura koja se javlja 8 do 10 dana nakon transfuzije, praćena unutar 24 do 48 sati pojavom makulopapuloznog osipa koji počinje na trupu, a potom se širi na ekstremitete, zahvaćujući dlanove i tabane. U teškim slučajevima osip može progredirati u generaliziranu eritrodermiju sa stvaranjem bula i deskvamacijom.

Disfunkcija jetre može biti različita intenziteta. Najčešće se vidi slika kolestatskog hepatitisa uz povećanje vrijednosti bilirubina i aktivnosti enzima alkalne fosfataze. Gastrointestinalne komplikacije variraju u rasponu od anoreksije i mučnine do obilnih proljevastih stolica.

U GVHD-u koji nastaje nakon transplantacije koštane srži primateljeva koštana srž je nadomještena davateljevom košta-

nom srži, pa ju davateljvi limfociti ne napadaju. Za razliku od toga, u TA-GVHD-u davateljvi limfociti prepoznaju koštanu srž primatelja kao stranu, napadaju i uništavaju matične krvotvorne stanice, što uzrokuje hipoplaziju i kasnije aplaziju koštane srži. Leukopenija i pancitopenija javljaju se oko 16. dana. Tijek bolesti je veoma brz i većina bolesnika umire 3 tjedna od pojave simptoma, najčešće zbog komplikacija zatajenja funkcija koštane srži. Imunosupresivna terapija koja se uspješno rabi u liječenju GVHD-a nakon transplantacije koštane srži, nije učinkovita u liječenju TA-GVHD-a koji stoga u pravilu ima smrtni ishod. Stopa smrtnosti je viša od 90%.<sup>25</sup>

Klinički simptomi TA-GVHD-a u novorođenčadi slični su kao i u odraslih, iako se znakovi bolesti javljaju nešto kasnije nakon transfuzije krvi te bolest u njih ima nešto duži tijek. Nažalost, TA-GVHD i u djece ima jednako visoku stopu smrtnosti kao i u odraslih bolesnika.<sup>26</sup> Najopsežnije izvješće o TA-GVHD-u u novorođenčadi je iz Japana, a daje detaljnu analizu tijeka bolesti u novorođenčadi (20 prematurusa i 7-ero donošene djece).<sup>27</sup> Desetero djece je liječeno eksangvinotransfuzijom s krvnim pripravcima članova obitelji, dvoje je primilo transfuziju perioperativno, a ostali su transfundirani zbog različitih indikacija. Najčešće je prvi simptom bila temperatura viša od 38°C, a javljala se 28 dana (medijan) nakon transfuzije, za razliku od odraslih u kojih se obično javljala nakon 10 dana. Zatim se javljao osip (medijan 30 dana), a potom leukopenija (medijan 43 dana). Svih 27-ero djece umrlo je (medijan 51 dan), unatoč pokušajima liječenja. Uzrok smrti bile su bakterijske, gljivične ili virusne infekcije.

Analizom rizičnih faktora nađeno je da je 23-je od 27-ero djece primilo transfuziju svježe pune krvi starosti do 72 sata nakon donacije, a 22-je djece primilo je krvni pripravak srodnog davatelja. Samo petero novorođenčadi primilo je isključivo krv nesrodnih davatelja.

U novorođenčadi TA-GVHD češće ostaje neprepoznat nego u odraslih. Osip kože je veoma čest zbog brojnih drugih razloga, a u prematurusa se javlja u 9–12% slučajeva.<sup>28</sup> Eritem kože često se javlja zbog uporabe inkubatora za održavanje temperature tijela djeteta i fototerapije pa značenje crvenila ili osipa kože može biti podcijenjeno. Uz to duži period od transfuzije do pojave kliničkih simptoma odgađa ili čak isključuje sumnju na dijagnozu, pa se kliničke manifestacije TA-GVHD-a pripisuju osnovnoj bolesti ili nedonošenosti.

### Dijagnostika

Dijagnoza TA-GVHD-a postavlja se na osnovi kliničke slike i patohistoloških nalaza biopsije tkiva uz dokaz presađivanja limfocita davatelja u tkivu primatelja. Nažalost, ne postoje patognomonična klinička obilježja koja razlikuju simptome TA-GVHD-a od simptoma različitih virusnih infekcija ili reakcija na lijekove.<sup>29</sup> Budući da bolesnici koji se liječe transfuzijom krvi obično pate od više bolesti koje mogu prikriti kliničku sliku, osobito ako liječnik ne sumnja na TA-GVHD, posebnu pozornost treba obratiti na skupine bolesnika koji imaju najveći rizik od nastanka TA-GVHD-a.

Za postavljanje dijagnoze TA-GVHD-a nužno je povezivanje kliničkih simptoma s rezultatima relevantnih laboratorijskih ispitivanja. U laboratorijskim nalazima obično se vidi leukopenija i pancitopenija, kao i abnormalni nalazi testova funkcija jetre. Obavezno je učiniti, ovisno o zahvaćenom organskom sustavu, biopsiju kože, jetre i/ili koštane srži. Karakteristične histološke promjene u koži najčešće su vakuolarna degeneracija bazalnog sloja epidermisa (stupanj I), uz infiltraciju epidermisa mononuklearnim stanicama (stupanj II), pa do stvaranja bula (stupanj III) i ulceracija kože (stupanj IV).<sup>11</sup> U jetri su obično zahvaćeni mali interlobularni i marginalni žučni vo-

dovi, a nalazi se degeneracija i nekroza malih žučnih vodova i periportalni infiltrati mononuklearnih stanica povezani s hepatocelularnom i kolangiolarom kolestazom.<sup>30</sup> Koštana srž može biti hipocelularna ili aplastična s infiltracijom limfocita i histocita te fibrozom. Karakteristične patohistološke promjene kože, jetre i koštane srži nisu patognomonične, već samo upućuju na TA-GVHD, a dijagnoza se potvrđuje tek identifikacijom limfocita davatelja u cirkulaciji ili tkivu primatelja. Za dokaz limfocita davatelja u primatelju rabe se tehnike koje su pouzdane u razlikovanju davateljevih od primateljevih stanica. HLA-tipiziranje, bilo serološko ili analizom DNA tehnikom lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) neizostavno je u dijagnostici TA-GVHD-a.<sup>31</sup> Tek dokaz davateljevih stanica ili DNA u cirkulaciji bolesnika ili u staničnim infiltratima povezan s kliničkim simptomima potvrđuje dijagnozu TA-GVHD-a. Identifikacija dodatnih ili različitih HLA-antigena od antigena bolesnika potvrđuje presađivanje transfundiranih stanica. Identificirani HLA-antigeni mogu se usporediti s HLA-antigenima davatelja krvnih pripravaka. Davateljeva DNA može se izolirati iz krvi ili staničnih infiltrata. Budući da se čista primateljeva DNA ne može uvijek lako izolirati iz krvi zbog uznapredovale aplazije koštane srži, kao alternativni izvori primateljeve DNA mogu se rabiti tkiva koja nisu »kontaminirana« davateljevim stanicama kao što su fibroblasti kože, kose ili čak nokti.<sup>32</sup>

Prisutnost stanica davatelja u primatelju može se dokazati i drugim metodama kao što su analiza polimorfizma mikrosatelitnih lokusa DNA, analiza varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (engl. variable number tandem repeat, VNTR) i citogenetička analiza stanica u slučaju kada su davatelj i primatelj različita spola.<sup>11,28,31</sup> Međutim, često se i uz primjenu ovih sofisticiranih tehnika ovaj sindrom sa sigurnošću dijagnosticira tek na autopsiji.

Samostalan nalaz davateljevih limfocita bez kliničkih simptoma nije indikativan za TA-GVHD. Miješani kimerizam, tj. prisutnost davateljevih i primateljevih hematopoetskih stanica nalazi se u bolesnika nakon transplantacije alogene koštane srži koji su klinički dobro. Jednako tako, mikrokimerizam (<2,5% davateljevih stanica) nalazi se u primatelja transplantata solidnih organa. U tih se osoba razvilo stanje tolerancije i nema znakova GVHD-a.<sup>33</sup>

### Liječenje

Liječenje TA-GVHD-a izuzetno je rijetko uspješno iako su u liječenju iskušani mnogi imunosupresivni lijekovi. Kortikosteroidi, antitimocitni globulin i ciklosporin A koji se obično uspješno primjenjuju u liječenju GVHD-a nakon presađivanja KMS-a, pokazali su se neučinkoviti u liječenju TA-GVHD-a.<sup>11,19,24</sup> Objavljeni su rijetki i pojedinačni slučajevi povoljnog odgovora na neke od ovih lijekova, iz kojih je nažalost teško izvući preporuke za kliničku praksu. U literaturi se nalazi tek nekoliko izvještaja o uspješnom liječenju kombinacijom ciklosporina i anti-CD3 monoklonskih protutijela (OKT3) ili antitimocitnim globulinom i steroidima.<sup>34,35</sup> Nafmostat mesilat, koji je inhibitor serinske proteaze i inhibira citotoksične T-limfocite, upotrebljavan je s prolaznim poboljšanjem.<sup>36</sup> Ispituje se i primjena klorokina, još jednog inhibitora serinske proteaze koji inhibira citotoksične T-stanice *in vitro*.<sup>37</sup> Razmatra se i primjena nekih novih lijekova koji se rabe u liječenju GVHD-a kao što su daklizumab, monoklonsko protutijelo koje se specifično veže na alfa-lanac receptora za IL-2 na površini aktiviranih limfocita, koji je pokazao obećavajuće rezultate u liječenju akutnog GVHD-a nakon transplantacije koštane srži rezistentnog na standardno liječenje.<sup>38</sup> Čini se da rana dijagnoza i početak liječenja ne utječu na ishod, jer bolesnici kod kojih je bolest ranije

dijagnosticirana nemaju bolji krajnji ishod liječenja od onih kod kojih je dijagnoza postavljena u kasnijem stadiju bolesti.

### Rizične skupine bolesnika

Rizik od pojave TA-GVHD-a za svaku pojedinu skupinu bolesnika teško je utvrditi osobito za bolesnike koji su vitalno ugroženi, s infekcijama ili višestruko transfundirani. Obično se prepoznaju samo teški slučajevi, a i oni često tek nakon smrti. Blaži slučajevi mogu proći neprepoznati ili se zamijene za virusne infekcije ili reakcije na lijekove, koje se manifestiraju sličnim simptomima. Prospektivna randomizirana istraživanja rizika od nastanka TA-GVHD-a ne postoje niti ih je moguće provesti s obzirom na poznatu visoku stopu smrtnosti. Tablica 1. prikazuje skupine bolesnika kod kojih postoji rizik od nastanka TA-GVHD-a. Bolesnici su podijeljeni u skupine s »visokim rizikom«, »minimalno povećanim rizikom« i u kojih »nije dokazan povećan rizik« od pojave TA-GVHD-a. Treba naglasiti da rizik od pojave TA-GVHD-a nije kvantitativno određen ni za jednu od ovih skupina bolesnika, već se identifikacija rizičnih skupina bolesnika zasniva na retrospektivnoj analizi objavljenih slučajeva TA-GVHD-a. U rizičnim skupinama bolesnika obavezna je prevencija pojave TA-GVHD-a primjenom ozračenih krvnih pripravaka.

#### TA-GVHD u imunokompromitiranih bolesnika

1. *Prirođeni sindromi imunodeficiencije.* Kod djece s prirođenim sindromom stanične imunodeficiencije postoji velik rizik od pojave TA-GVHD-a, između ostaloga i stoga što su oni često transfundirani prije nego što se postavi dijagnoza imu-

Tablica 1. Rizične skupine bolesnika i klinička stanja u kojima je izvješteno o pojavi TA-GVHD-a

Table 1. Patient risk groups and clinical settings in which TA-GVHD has been reported

Visok rizik / High risk
Prirođeni sindromi stanične imunodeficiencije Congenital immunodeficiency syndromes
Imunosna nezrelost (fetus/prematurus) Immunologic immaturity (fetus/premature infant)
Intrauterina transfuzija/Intrauterine transfusion Eksangvinotransfuzija/Exchange transfusion
Stečeni defekt T-stanica/Acquired T-cell defects Transplantacija koštane srži: alogene i autologne Bone marrow transplantation: allogeneic/autologous Hodgkinova bolest/Hodgkin's disease
Davatelj i primatelj imaju zajednički HLA-haplotip Haplotype sharing between donor and recipient Transfuzija krvnog pripravka srodnog davatelja Transfusion from blood relatives HLA-podudarni trombociti/HLA-matched platelets
Primatelji transfuzija koncentrata granulocita Granulocyte concentrate recipients
Minimalno povećan rizik/Minimally increased risk
Hematološke maligne bolesti (ne-Hodgkinov limfom, akutna i kronična leukemija)/Hematologic malignancies (non-Hodgkin's lymphoma, acute and chronic leukaemia)
Solidni tumori intenzivno liječeni kemoterapijom ili radioterapijom Solid tumours treated with intensive chemotherapy or radiotherapy
Prematurusi – transfuzije malog volumena krvi Pre-term infants – small volume transfusion
Neonatusi – transfuzije velikog volumena krvi Newborns – large volume transfusion
Nije dokazan povećan rizik/Not reported increased risk
Sindrom stečene imunodeficiencije (AIDS) Acquired immunodeficiency syndrome
Novorođenčad – transfuzije malog volumena Newborns – small volume transfusion

nodeficiencije. TA-GVHD se ne nalazi samo u djece s teškim kombiniranim deficitom imunskog sustava (engl. severe combined immunodeficiency, SCID), već i u drugim sindromima s deficitom funkcije T-stanica kao što su Wiskott-Aldrichov sindrom, DiGeorgeov sindrom i manjak purinske nukleozid fosforilaze.<sup>4,26,39</sup> U djece s humoralnom imunodeficiencijom nije povećan rizik od nastanka TA-GVHD-a.

2. *Fetusi, prematurusi i novorođenčad.* Poznato je da novorođena djeca imaju nezreli imunski sustav, međutim da li i koliko ta činjenica utječe na rizik od pojave TA-GVHD-a u ovoj skupini bolesnika nije potpuno razjašnjeno. Prematurusi imaju još nezreliji imunski sustav od ostale novorođenčadi pa bi u njih rizik bio još veći. Osim toga u ovoj skupini bolesnika postoji praksa transfuzije svježe krvi i krvi članova obitelji. Većina objavljenih slučajeva TA-GVHD-a u ovoj skupini bolesnika uslijedila je nakon transfuzije krvi srodnih davatelja, a rjeđe nakon intrauterine transfuzije i eksangvinotransfuzije.<sup>27,39,40</sup>

*Intrauterine transfuzije i eksangvinotransfuzije:* Visok rizik od nastanka TA-GVHD-a postoji u djece koja su liječena intrauterinim transfuzijama, a nakon rođenja dodatno i eksangvinotransfuzijama.<sup>40</sup> Limfociti transfundirani tijekom intrauterine transfuzije izazivaju stanje nespecifične tolerancije iscrpljivanjem imunskog sustava fetusa, što stvara uvjete za nastanak TA-GVHD-a u daljnjem transfuzijskom liječenju. Smatra se da su ostali slučajevi TA-GVHD-a u novorođenčadi nakon eksangvinotransfuzije posljedica relativne imunodeficiencije, koja nastaje nakon transfuzije velikog volumena svježe krvi u kojoj se nalazi velik broj vijabilnih limfocita koje nezreli imunski sustav djeteta nije u stanju svladati. Iz istog razloga TA-GVHD nastaje i nakon transfuzije majčinih trombocita koji se primjenjuju u liječenju neonatalne aloimune trombocitopenije.<sup>11</sup>

Zbog prethodno iznesenih razloga i činjenice da se za intrauterinu transfuziju rabi svježa krv sve intrauterine transfuzije smatraju se visoko rizičnima i krvni pripravci moraju biti ozračeni. Intrauterine transfuzije su uvijek planirane pa zračenje ovih pripravaka neće odgoditi liječenje. S druge strane, kod eksangvinotransfuzije osnovni je cilj u što kraćem vremenu zbrinuti novorođenče. Stoga, iako bi bilo optimalno zračiti krv za sve eksangvinotransfuzije, ako bi odgađanje liječenja zbog zračenja krvnog pripravka ugrozilo novorođenče, može se primijeniti i neozračen krvni pripravak. Obavezno je zračiti krvne pripravke za eksangvinotransfuziju djece koja su prethodno liječena intrauterinim transfuzijama jer kod njih postoji visok rizik od pojave TA-GVHD-a.

*Prematurusi:* Većina slučajeva TA-GVHD-a u prematurusa javila se nakon transfuzije krvi članova obitelji. Iako su prerano rođena djeca često transfundirana, do sada je opisano samo 7 slučajeva TA-GVHD-a u prematurusa liječenih krvnim pripravcima nesrodnih davatelja pa se smatra da je rizik od nastanka TA-GVHD-a u njih nizak.<sup>27,39,41,42</sup>

*Donošena novorođenčad:* Smatra se da rizik od TA-GVHD-a u zdrave donošene novorođenčadi transfundirane krvnim pripravcima nesrodnih davatelja nije veći nego u ostalih imunokompetentnih primatelja krvi.<sup>11</sup> Izuzetak čine transfuzije krvi srodnih davatelja, što predstavlja rizični faktor i u ostalih grupa bolesnika bez obzira na status njihova imunskog sustava.

3. *Bolesnici s hematološkim malignim bolestima.* Većina objavljenih slučajeva TA-GVHD-a javila se u bolesnika s hematološkim malignim bolestima koji su liječeni citotoksičnom kemoterapijom i/ili zračenjem.<sup>43</sup> Najveći broj slučajeva TA-GVHD-a opisan je u bolesnika s Hodgkinovom bolesti zbog oslabljene stanične imunosti koja se javlja u ovoj bolesti.<sup>11,44</sup> U bolesnika s drugim hematološkim malignim bolestima, kao što je akutna leukemija, koji su liječeni intenzivnom kemote-

rapijom također je opisan TA-GVHD.<sup>45</sup> Bolesnici s kroničnom limfocitnom leukemijom koji su liječeni fludarabinom, izloženi su većem riziku zbog produženog imunosupresivnog učinka ovog analoga purina na staničnu imunost.<sup>48</sup> Budući da se u bolesnika s hematološkim malignim bolestima češće javlja refrakternost na transfuzije trombocita, oni su liječeni trombocitnim pripravcima HLA-podudarnih davatelja, što dodatno u njih povećava rizik od nastanka TA-GVHD-a.<sup>11,24</sup>

Iako se smatralo da u bolesnika s ne-Hodgkinovim limfomom (NHL) ne postoji rizik od nastanka TA-GVHD-a, i u njih su nedavno opisani slučajevi TA-GVHD-a.<sup>46</sup> S obzirom na to da ti bolesnici s NHL-om nisu primali intenzivnu kemoterapiju, niti su imali neki drugi rizični faktor, otvara se pitanje može li NHL sam po sebi biti rizičan faktor za nastanak TA-GVHD-a i treba li proširiti indikacije za zračenje staničnih krvnih pripravaka i za te bolesnike.<sup>46,47</sup>

4. *Transplantacija koštane srži.* Mijeloablativna kemoterapija koja se primjenjuje u transplantaciji alogene i autologne koštane srži uzrokuje jaku imunosupresiju i stvara uvjete za nastanak TA-GVHD-a.<sup>11</sup>

*Alogena koštana srž:* Svi se stanični krvni pripravci za sve bolesnike liječene transplantacijom alogene koštane srži zrače još od prvog izvješća o TA-GVHD-u.<sup>49</sup> Zračenje krvnih pripravaka obavezno je od početka kondicioniranja kemoterapijom i/ili radioterapijom pa sve dok bolesnik prima GVHD-profilaksu, tj. obično 6 mjeseci nakon transplantacije ili dok je limfocita manje od  $1 \times 10^9/L$ . Za transplantirane bolesnike sa SCID-om prevencija TA-GVHD-a je obavezna još dvije godine nakon transplantacije. Kod bolesnika s kroničnim GVHD-om potrebno je zračiti krvne pripravke dok god primaju imunosupresivnu terapiju.

*Autologna koštana srž:* Za bolesnike liječene transplantacijom autologne koštane srži isprva nije bilo preporučeno zračenje krvnih pripravaka. Nakon objavljivanja izvješća o TA-GVHD-u i u ovih je bolesnika danas uobičajena prevencija TA-GVHD-a od početka pripreme za transplantaciju kemoterapijom i/ili radioterapijom pa do 3 mjeseca nakon transplantacije, odnosno 6 mjeseci ako je u pripremi za transplantaciju zračeno cijelo tijelo.<sup>50</sup> Važno je naglasiti da TA-GVHD u njih mogu uzrokovati i alogeni krvni pripravci transfundirani prije skupljanja autoložnih hematopoetskih matičnih stanica iz koštane srži ili iz periferne krvi. Vijabilni T-limfociti iz alogenog pripravka koji su skupljeni u autoložni pripravak hematopoetskih matičnih stanica mogu preživjeti zamrzavanje i nakon reinfuzije imunosuprimiranom primatelju izazvati TA-GVHD. Stoga i krvne pripravke transfundirane u vrijeme skupljanja hematopoetskih matičnih stanica treba zračiti.

5. *Bolesnici sa solidnim tumorima.* Opisani su pojedinačni slučajevi pojave TA-GVHD-a u bolesnika sa solidnim tumorima, kao što je neuroblastom, rabdomiosarkom, karcinom mokraćnog mjehura, pluća, bubrega, jednjaka i prostate.<sup>11,50,51</sup> Danas liječenje bolesnika sa solidnim tumorima postaje sve intenzivnije jer se primjenjuju sve više doze citostatika koje izazivaju jaču imunosupresiju i mijeloablaciju. Zbog toga ovi bolesnici trebaju i više transfuzija krvi te rizik od nastanka TA-GVHD-a postaje sve veći.

6. *Bolesnici liječeni transplantacijom solidnih organa.* TA-GVHD se rijetko javlja u bolesnika liječenih transplantacijom solidnih organa iako je ova skupina bolesnika jako imunosuprimirana i politransfundirana. GVHD u ovoj skupini bolesnika obično nastaje zbog proliferacije limfocita iz transplantiranog organa, a ne kao posljedica transfuzije.<sup>52</sup> Do sada je izviješteno o pojavi TA-GVHD-a u jednom slučaju nakon transplantacije srca i jednom nakon transplantacije jetre.<sup>53,54</sup> Da bi se moglo razlikovati je li riječ o GVHD-u izazvanom transfu-

zijom ili transplantacijom solidnih organa, potrebno je odrediti potječu li limfociti od davatelja organa ili davatelja krvi.

7. Bolesnici sa stečenim sindromom imunodne deficijencije (engl. acquired immune deficiency syndrome, AIDS). AIDS se ne smatra rizičnim faktorom za nastanak TA-GVHD-a.<sup>11</sup> Do sada je objavljen samo jedan slučaj TA-GVHD-a u djevojčice s AIDS-om, a bolest se na liječenje povukla.<sup>55</sup> Nije razjašnjeno zašto se bolest ne javlja u ovoj skupini imunosuprimiranih bolesnika. Postoji mogućnost da u njih TA-GVHD ostaje neprepoznat i da je on u stvari odgovoran za neke nespecifične znakove i simptome koji se sada pripisuju osnovnoj bolesti, nuspojavama lijekova i drugim istodobno prisutnim medicinskim problemima bolesnika s AIDS-om. S druge strane neki kvalitativni aspekti imunskog deficita izazvanog infekcijom HIV-om mogu promijeniti sklonost bolesnika s AIDS-om za nastanak TA-GVHD-a. Naposljetku, možda se i transfundirani limfociti davatelja inficiraju HIV-om i zato više nisu sposobni izazvati GVHD.<sup>56</sup>

#### *TA-GVHD u imunokompetentnih primatelja*

Opisani su brojni slučajevi TA-GVHD-a u imunokompetentnih bolesnika s različitim kliničkim stanjima nakon kardio-kirurških, vaskularnih, abdominalnih i traumatoloških operacija, alfa-talasemije i reumatoidnog artritisa.<sup>16,19,57,58</sup> Većina tih slučajeva nastala je nakon transfuzije svježe krvi jednosmjernom HLA-podudarnosti između davatelja i primatelja.<sup>8,19</sup> Direktna donacija krvi od bliskih rođaka povećava rizik od nastanka TA-GVHD-a zbog češće jednosmjerne HLA-podudarnosti unutar obitelji. Učestalost jednosmjerne HLA-podudarnosti između primatelja i nesrodnih davatelja ovisi o HLA-homogenosti populacije, pa je i rizik od pojave TA-GVHD-a najveći u zemljama s velikom genskom homogenosti kao što je Japan.<sup>16</sup>

Transfuzije trombocita HLA-podudarnih davatelja koje se rabe u liječenju aloimuniziranih bolesnika refrakternih na standardne transfuzije trombocita prati povećan rizik od pojave TA-GVHD-a jer imunokompetentni primatelj ne prepoznaje HLA-podudarne limfocite iz pripravaka trombocita kao strane i ne može ih odbaciti.<sup>24</sup>

### Prevenција

Budući da je liječenje TA-GVHD-a u pravilu neučinkovito, od osobite je važnosti prevencija bolesti. Prevencija se temelji na metodama inaktivacije limfocita u krvnim pripravcima.

#### *Smanjenje broja leukocita*

Iako bi se smanjenje broja vijabilnih leukocita u krvnim pripravcima teoretski moglo iskoristiti za prevenciju pojave TA-GVHD-a, ono se u praksi ne može samostalno primjenjivati u rizičnim skupinama bolesnika. Budući da nije točno definiran minimalni broj T-limfocita potrebnih za izazivanje GVHD-a, ne može se propisati ni dopušten broj preostalih vijabilnih limfocita u krvnom pripravku. Metode koje su do sada dostupne za fizičko uklanjanje T-limfocita pranjem ili filtracijom krvnih pripravaka nisu učinkovite u profilaksi, što potvrđuje pojava TA-GVHD-a i u imunokompetentnih i u imunokompromitiranih primatelja nakon transfuzije krvnih pripravaka sa smanjenim brojem leukocita.<sup>59,60</sup>

#### *Zračenje krvnih pripravaka gama-zrakama*

Zaštitni učinak zračenja krvnih pripravaka prvi put je opisan 1959. godine u miševa, a dvije godine kasnije i u ljudi.<sup>11</sup> Zračenje krvnih pripravaka gama-zrakama inhibira proliferaciju i diobenu sposobnost T-limfocita, pa je stoga za sada i jedina učinkovita metoda prevencije TA-GVHD-a. Za preven-

ciju je odabrana doza zračenja koja će inhibirati proliferaciju limfocita, a istodobno neće imati neželjen učinak na funkciju eritrocita, trombocita ni granulocita. Istraživanje optimalne doze zračenja pokazala su da doze zračenja od 25 do 30 Gy potpuno inhibiraju proliferaciju T-stanica.<sup>61</sup>

The British Council for Standards in Haematology (BCSH) kao i preporuke Vijeća Europe za prevenciju TA-GVHD-a preporučuju minimalnu dozu od 25 Gy, a ni jedan dio pripravka ne smije primiti više od 50 Gy.<sup>62,63</sup> American Association of Blood Banks (AABB) preporučuje dozu od minimalno 25 Gy na središte krvnog pripravka, uz uvjet da ni jedno područje ne primi manje od 15 Gy ni više od 50 Gy.<sup>64</sup> U japanskim preporukama navodi se doza od 15 do 50 Gy.<sup>65</sup> Svaka od ovih doza, ako se pravilno primijeni, treba biti dostupna za prevenciju TA-GVHD-a.

#### Učinak zračenja na krvne pripravke

Radi osiguranja učinkovitosti i sigurnosti krvnog pripravka ispitan je učinak doza zračenja optimalnih za prevenciju TA-GVHD-a na različite krvne sastojke. Studije su pokazale da je nakon doza od 25 do 30 Gy oporavak i preživljavanje trombocita unutar zahtjeva kvalitete.<sup>66</sup> Kemotaktična funkcija granulocita smanjuje se kod doza zračenja viših od 100 Gy, a fagocitna i baktericidna funkcija su smanjene tek kod doza viših od 400 Gy.<sup>67</sup> Budući da su istraživanja pokazala da doze zračenja od 25 do 50 Gy ne smanjuju vijabilnost trombocita ni granulocita, kao ni kliničku učinkovitost ozračenih trombocita i granulocitnih pripravaka, u svim preporukama se navodi da se koncentracije trombocita i granulocita mogu ozračiti tijekom cijelog vremena pohrane te da zračenje ne skraćuje rok njihove valjanosti.<sup>62-65</sup>

Tijekom zračenja eritrocitnih pripravaka dolazi do oštećenja membrane eritrocita i ključnih enzimskih sustava, što tijekom pohrane smanjuje njihovu vijabilnost. Studije koje su ispitivale učinak gama-zračenja na kvalitetu eritrocitnih krvnih pripravaka pokazuju pojačan izlazak iona kalija i unos iona natrija u eritrocite, smanjuje vrijednost ATP-a, kao i povećanje vrijednosti slobodnog hemoglobina i laktat dehidrogenaze (LDH) u supernatantu ozračenog krvnog pripravka.<sup>68</sup> Povećan izlaz iona kalija uz istodoban ulaz iona natrija u eritrocit uzrokuje značajan poremećaj metabolizma energije u eritrocitu, što može promijeniti stabilnost membrane, smanjiti njezinu elastičnost i uzrokovati hemolizu eritrocita. Smatra se da su opisane promjene odgovorne za slabiji oporavak ozračenih eritrocita *in vivo* nakon transfuzije.<sup>11,68</sup>

Rok valjanosti ozračenih eritrocitnih krvnih pripravaka skraćuje se na 28 dana od zračenja ili do roka valjanosti navedenog na originalnoj dozi ako on nastupi ranije.<sup>62-65</sup> Iako se u ozračenju dozi eritrocitnog pripravka nakon pohrane od više dana razina kalija u supernatantu podiže za 1–2 mEq/dozi, polagana transfuzija takvog pripravka nije problem u odraslih osoba. Ove promjene treba uzeti u obzir kod brze transfuzije velikog volumena ozračenih krvi bolesnicima osjetljivim na hiperkalemiju, kao što su prematurusi i bolesnici s teškim oštećenjem bubrežne funkcije.<sup>39</sup> Eritrocitni pripravci za intrauterine transfuzije, eksangvinotransfuzije, novorođenčad i djecu trebaju biti ozračeni neposredno prije primjene, a kada to nije moguće, supernatant treba ukloniti nakon centrifugiranja ili pranjem eritrocita.<sup>64</sup>

Kontrola kvalitete opreme za zračenje krvnih pripravaka nužna je za osiguranje primjene točne doze zračenja. Iako je zračenje trenutno najpouzdanija metoda prevencije TA-GVHD-a, u literaturi su objavljeni slučajevi TA-GVHD-a nakon primjene ozračenih krvnih pripravaka. TA-GVHD opisan je u tri bolesnika transfundirana ozračenom krvju, u dvoje s dozom od 20 Gy, a u jednoga s 15 Gy.<sup>69</sup> Nije razjašnjeno jesu li ti slučajevi po-

sljedica greške u procesu zračenja ili nedovoljne doze primijenjenog zračenja.

#### Organizacija programa zračenja krvnih pripravaka

Uvođenje programa zračenja krvnih pripravaka radi prevencije TA-GVHD-a zahtijeva donošenje specifičnih odluka glede organizacije postupaka zračenja krvnih pripravaka i njihove kliničke primjene. Potrebno je riješiti logistička pitanja: izdvojenu pohranu ozračenih pripravaka, smanjenje roka valjanosti ozračenih eritrocita, zračenje krvnih pripravaka u hitnim slučajevima, kao i zračenje u manjim bolničkim ustanovama.

Aparati za zračenje krvnih pripravaka sadržavaju izvor gama-zračenja dugog poluzivota, obično cezij 137 ili kobalt 60. Doza zračenja i distribucija doze treba biti provjerena nakon instalacije, jedanput na godinu te nakon promjene izvora.<sup>62</sup> Laboratoriji koji zrače krvne pripravke u suradnji s medicinskim fizičarima trebaju definirati postupak zračenja i planirati redovitu kontrolu opreme. Ako se zračenje provodi linearnim akceleratorom ili kobaltnom bombom, fizičari trebaju izraditi planove zračenja.

FDA je 1993. godine postavio specifične zahtjeve za zračenje krvnih pripravaka u SAD-u.<sup>64</sup> Sve ustanove koje zrače krvne pripravke moraju biti registrirane i licencirane prema zahtjevima dobre priređivačke prakse, čak kada se ozračeni pripravci primjenjuju samo unutar te ustanove. Nužno je dokumentirati nje svih ključnih koraka u procesu zračenja, a ozračen pripravak mora biti jasno označen naljepnicom koja sadržava datum zračenja i eventualnu promjenu roka valjanosti.

#### Indikacije za zračenje

Indikacije za zračenje se proširuju kako raste broj izvješća o TA-GVHD-u. Neke su zemlje u preporukama detaljno definirale kliničke indikacije za primjenu ozračenih krvnih pripravaka. Indikacije za zračenje u američkim, britanskim i europskim preporukama su slične. Zračenje staničnih krvnih pripravaka nedvojbeno je indicirano u bolesnika s visokim rizikom od nastanka TA-GVHD-a, kao i za sve intrauterine transfuzije, krvne pripravke srodnih davatelja i davatelja HLA-podudarnih s primateljem. Ni u jednoj od tih zemalja zračenje krvnih pripravaka nije obavezno za kardiokirurške bolesnike niti za prematuruse.

Japanske preporuke za zračenje krvnih pripravaka koje su objavljene 2000. godine odražavaju rizične faktore koji su specifično prisutni u njihovoj populaciji.<sup>65</sup> Njihove indikacije za zračenje znatno su šire te preporučuju zračenje krvnih pripravaka za kardiokirurške operacije, kirurške zahvate zbog malignih bolesti, za masivnu transfuziju, kao i za primatelje starije od 65 godina. Ne preporučuju transfuziju svježe krvi starosti do 3 dana, a ako je ipak klinički indicirana, onda se takav pripravak mora ozračiti.

Donošenje nacionalnih preporuka za profilaksu TA-GVHD-a zahtjevan je posao, a najbolje ga je provesti interdisciplinarno. Transfuziolozi trebaju pribaviti većinu potrebnih informacija o slučajevima TA-GVHD-a, tehnikama zračenja, odabiru i kvaliteti krvnih pripravaka, a kliničari uključeni u primjenu krvnih pripravaka trebaju dati detaljne podatke o protokolima liječenja i kirurškim zahvatima prema skupinama bolesnika. Na taj će način nastati preporuke i standardi koji će odgovarati okolnostima u pojedinoj zemlji te će biti garancija primjene donesenih preporuka.

#### Učinkovitost zračenja u prevenciji TA-GVHD-a

Učinkovitost uvođenja mjera za prevenciju TA-GVHD-a najbolje se vidi na podacima iz Japana. U razdoblju od 1981.

1986. u 340 bolnica učinjeno je više od 60 000 kardiokirurških procedura, a u 96 (0,15%) bolesnika javio se TA-GVHD.<sup>70</sup> Broj zabilježenih slučajeva nastavlja rasti do 1990, vjerojatno zbog povećane pozornosti, prepoznavanja kliničke slike i napretka u dijagnostici. Početkom devedesetih godina broj slučajeva TA-GVHD-a se polagano smanjuje, što se pripisuje uvođenju preventivnih mjera: zračenje krvnih pripravaka, smanjenje uporabe svježe krvi i krvi srodnih davatelja.<sup>71</sup> S uvođenjem strožih preporuka u Japanu je došlo do daljnjeg smanjenja broja TA-GVHD-a pa je od 1993. do 1997. broj prijavljenih slučajeva na godinu bio od 9 do 14. U 1998. godini prijavljena su dva slučaja, u 1999. četiri slučaja te ni jedan u 2000. i 2001. godini. U istom razdoblju primijenjeno je približno 18 milijuna staničnih krvnih pripravaka, a više od 95% ih je prethodno ozračeno.<sup>28</sup> Ovi rezultati nedvojbeno pokazuju da se zračenje krvnih pripravaka pojava TA-GVHD-a može uspješno spriječiti.

#### Inaktivacija patogena fotokemijskom obradom krvnih pripravaka

Istraživanja na eksperimentalnim životinjama pokazala su da fotokemijska obrada krvnih pripravaka koja se primjenjuje za inaktivaciju bakterija i virusa u staničnim krvnim pripravcima sprečava i pojavu TA-GVHD-a. Za inaktivaciju mikroorganizama rabi se psoralen S59 i ultraljubičasto A-svjetlo ili fotoaktivne fenotiazinske boje. Ovom se metodom inaktiviraju virusi i bakterije, ali i T-limfociti koji nakon fotokemijske inaktivacije više nisu sposobni proliferirati i izazvati TA-GVHD. Ako se ovi rezultati potvrde u kliničkim istraživanjima, fotokemijska obrada mogla bi se iskoristiti osim za sprečavanje infekcija uzročnicima krvlju prenosivih bolesti i za imunološke komplikacije transfuzijskog liječenja.<sup>62</sup> U tijeku je prva faza kliničkog istraživanja prevencije TA-GVHD-a primjenom derivata psoralena S-59, koji se primjenjuje za inaktivaciju mikroorganizama u koncentratima trombocita.<sup>72</sup>

### Zaključak

TA-GVHD rijetka je komplikacija transfuzije krvnih pripravaka, koja zbog neuspješnog liječenja gotovo uvijek ima letalan ishod. Zračenje gama-zrakama za sada je jedina učinkovita metoda prevencije i nedvojbeno je indicirano u bolesnika s visokim rizikom od nastanka TA-GVHD-a. Zračenje svih staničnih krvnih pripravaka za sve bolesnike indicirano je samo u zemljama s genski homogenom populacijom kao što je Japan gdje postoji veća mogućnost pojave jednosmjerne HLA-podudarnosti.

Osobito je važno da kliničari imaju dovoljno znanja o TA-GVHD-u, rizičnim skupinama bolesnika, dijagnostici te mogućnostima prevencije primjenom ozračenih staničnih krvnih pripravaka. Transfuzijska služba mora razviti odgovarajući program prevencije u skladu s preporukama i faktorima specifičnim za određenu populaciju. Prevencija može biti učinkovita samo kad su identificirane rizične skupine bolesnika i za njih se primjenjuju preporučeni standardno ozračeni krvni pripravci.

### LITERATURA

1. Billingham RE. The biology of graft-vs-host reactions. Harvey Lect 1966; 67:62:21-78.
2. Mathe G, Bernard J, Schwarzenberg L. New trials with homologous bone marrow grafts after total irradiation in children with acute leukemia in remission. The problem of the secondary syndrome in man. Revues Hematologique (Paris) 1960;15:115-61.
3. Shimoda T. On postoperative erythroderma. Geka 1955;17:487-92.
4. Hathaway WE, Brangle RW, Nelson TL, Roedel IE. Aplastic anemia and lymphocytosis in an infant with hypogammaglobulinemia: Graft-vs-host reaction? J Pediatr 1966;68:713-22.
5. Aoki Y, Nakamura H, Sakakibara Y. Probable graft-versus-host reaction following massive blood transfusion in an aged patient with postoperative aortic aneurysm: a case report. Nippon Naika Gakkai Zasshi 1984;73: 1209-16.
6. Ito K, Fujita M, Norioka M i sur. Postoperative erythroderma with change of HLA phenotypes from heterozygotes to homozygotes: report of two cases. Eur J Haematol 1991;46:217-22.
7. Golumy E, Schipper R, Pool J i sur. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. N Engl J Med 1996;334:281-5.
8. Shivdasani RA, Hluska FG, Dock NL i sur. Graft-vs-host disease associated with transfusion of blood from unrelated HLA-homozygous donors. N Engl J Med 1993;328:766-70.
9. Shivdasani RA, Anderson KC. HLA homozygosity and shared HLA haplotypes in the development of transfusion-associated graft-vs-host disease. Leuk Lymphoma 1994;15:227-34.
10. Lee TH, Donegan E, Slichter S, Busch MP. Transient increase in circulating donor leukocytes after allogeneic transfusions in immunocompetent recipients compatible with donor cell proliferation. Blood 1995;85: 1207-14.
11. Webb LJ, Kenneth CA. Transfusion-associated graft-vs-Host Disease. In: Popovsky MA, ed. Transfusion reactions, Bethesda, MD: AABB Press, 2001:171-86.
12. Ferrara JLM, Antin JH. The pathophysiology of graft-versus-host disease. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, ed: Hematopoietic cell transplantation. Oxford: Blackwell Science, 1999:305-15.
13. Ferrara JL, Krenger W. Graft-vs-host disease: the influence of type 1 and type 2 T cell cytokines. Transfus Med Rev 1998;12:1-17.
14. Antin JH, Ferrara JL. Cytokine dysregulation and acute graft-vs-host disease. Blood 1992;80:2964-8.
15. Nishimura M, Uchida S, Mitsunaga S i sur. Characterisation of T-cell clones derived from peripheral blood lymphocytes of a patient with transfusion-associated graft-versus-host disease: Fas-mediated killing by CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell clones and tumor necrosis factor beta production by CD4+ T-cell clones. Blood 1997;89:1440-5.
16. Ohto H, Anderson KC. Survey of transfusion-associated graft-versus-host disease in immunocompetent recipients. Transfus Med Rev 1996;10: 31-4.
17. Wagner FF, Flegel WA. Transfusion-associated graft-versus-host disease: risk due to homozygous HLA haplotypes. Transfusion 1995;35:284-91.
18. Goodnough LT, Johnston MF, Ramsey G i sur. Guidelines for transfusion support in patients undergoing coronary artery bypass grafting. Ann Thorac Surg 1990;50:675-83.
19. Petz LD, Calhoun L, Yam P i sur. Transfusion-associated graft-vs-host disease in immunocompetent patients: Report of a fatal case associated with transfusion of blood from a second-degree relative, and a survey of predisposing factors. Transfusion 1993;33:742-50.
20. Mincheff M. Changes in donor leukocytes during blood storage. Implications on posttransfusion immunomodulation and transfusion-associated GVHD. Vox Sang 1998;74:189-200.
21. Chang H, Voralia M, Bali M, Sher GD, Branch DR. Irreversible loss of donor blood leukocyte activation may explain a paucity of transfusion-associated graft-versus-host disease from stored blood. Br J Haematol 2000;111:146-56.
22. Weiding JU, Vehmeyer D, Dittman J i sur. Contamination of fresh-frozen plasma with viable white cells and proliferable stem cells. Transfusion 1994;34:185-6.
23. Perkins HA. Granulocyte concentrates: should they be routinely irradiated? Prog Clin Biol Res 1981;65:49-57.
24. Benson K, Marks AR, Marshall MJ, Goldstein JD. Fatal graft-vs-host disease associated with transfusions of HLA-matched, HLA-homozygous platelets from unrelated donors. Transfusion 1994;34:432-7.
25. Mori S, Matsushita H, Ozaki K i sur. Spontaneous resolution of transfusion-associated graft-vs-host disease. Transfusion 1995;35:431-5.
26. Sanders MR, Graeber JE. Posttransfusion graft-versus-host disease in infancy. J Pediatr 1990;117:159-63.
27. Ohto H, Anderson KC. Posttransfusion graft-vs-disease in Japanese newborns. Transfusion 1996;36:117-23.
28. Schroeder ML. Transfusion-associated graft-versus-host disease. Br J Haematol 2002;117:275-87.
29. Shivdasani RA, Anderson KC. Transfusion associated graft-vs-host disease: Scratching the surface. Transfusion 1993;33:696-7.
30. Sale GE, Shulman HM, Hackman RC. Pathology of hematopoietic cell transplantation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, ed: Hematopoietic cell transplantation. Oxford: Blackwell Science, 1999:248-63.
31. Hayakawa S, Chishima F, Sakata H i sur. A rapid molecular diagnosis of posttransfusion graft-vs-host disease. Transfusion 1993;33:413-7.
32. Uchida S, Wang L, Yahagi Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Fuji T. Utility of fingernail DN for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation and for diagnostic testing for transfusion-associated graft-versus-host disease. Blood 1996;87:4015-6.
33. Strob R, Yu C, McSweeney P. Mixed chimerism after transplantation of allogeneic hematopoietic cells. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, ed: Hematopoietic cell transplantation. Oxford: Blackwell Science, 1999: 287-98.



34. Yasukawa M, Shinozaki F, Hato T *i sur.* Successful treatment of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 1994;86:831–6.
35. Prince M, Szer J, van der Weyden MB, Pedersen JS, Holdsworth RF, Whyte G. Transfusion associated graft-versus-host disease after cardiac surgery: response to antithymocyte-globulin and corticosteroid therapy. *Aust N Z J Med* 1991;21:43–6.
36. Ryo R, Saigo K, Hashimoto M *i sur.* Treatment of post-transfusion graft-versus-host disease with nafmostat mesilate, a serine protease inhibitor. *Vox Sang* 1999;76:241–6.
37. Nishimura M, Hidaka N, Akaza T, Tadokoro K, Juji T. Immunosuppressive effects of chloroquine: potential effectiveness for treatment of post-transfusion graft-versus-host disease. *Transfus Med* 1998;8:209–14.
38. Przepiorka D, Kernan NA, Ippoliti *i sur.* Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood* 2000;95:83–9.
39. Strauss RG. Data-driven blood banking practices for neonatal RBC transfusions. *Transfusion* 2000;40:1528–40.
40. Neiman JL, Punnett HH, Lischner HW. Possible graft-versus-host reaction after intrauterine transfusion for Rh erythroblastosis fetalis. *N Engl J Med* 1969;281:697–701.
41. Wise BV, Lawrence NL. A risk of blood transfusion for premature infants. *MNC AM J Matren Child Nurs* 1990;15:86–9.
42. Berger RS, Dixon SL. Fulminant transfusion-associated graft-vs-host disease in a premature infant. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:945–50.
43. Kessinger A, Armitage JO, Klassen LW, Landmark JD, Hayes JM, Larsen AE. Graft versus host disease following transfusion of normal blood products to patients with malignancies. *J Surg Oncol* 1987;36:206–9.
44. Decoste SD, Boudreaux C, Dover JS. Transfusion-associated graft-vs-host disease in patients with malignancies. Report of two cases and review of the literature. *Arch dermatol* 1990;126:1324–9.
45. Nikoskelainen J, Soderstrom KO, Rajamaki A *i sur.* Graft-versus-host reaction in 3 adult leukaemia patients after transfusion of blood cell products. *Scand J Haematol* 1983;31:403–9.
46. Gelly KJ, Kerr R, Rawlinson S, Norris A, Bowen DT. Transfusion-associated graft vs. host disease in a patient with high grade B-cell lymphoma. Should cellular products for patients with non-Hodgkin's lymphoma be irradiated? *Br J Haematol* 2000;100:228–9.
47. Munro LR, Culligan DJ, Grant A, Johnston PW, Watson HG. Transfusion-associated graft-versus-host disease in a patients with Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Vox Sang* 2002;83:279–81.
48. Williamson LM, Wimperis JZ, Wood ME, Woodcock B. Fludarabine treatment and transfusion-associated graft-vs-host disease. *Lancet* 1996;348:472–3.
49. Thomas ED, Herman EC, Greenough WB. Irradiation and marrow infusion in leukemia. *Arch Intern Med* 1961;107:829–45.
50. Postmus PE, Mulder NH, Elema JD. Graft vs host disease after transfusion of non-irradiated blood cells in patients having received autologous bone marrow: A report of 4 cases following ablative chemotherapy for solid tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:889–94.
51. Kennedy J, Ricketts R. Fatal graft vs host disease in a child with neuroblastoma following a blood transfusion. *J Pediatr Surg* 1986;21:1108–9.
52. Triuzli DJ, Nalesnik MA. Microchimerism, GVHD and tolerance in solid organ transplantation. *Transfusion* 2001;41:419–26.
53. Sola MA, Espana A, Redondo P *i sur.* Transfusion-associated acute graft-versus-host disease in a heart transplant recipient. *Br J Dermatol* 1995;132:626–30.
54. Wisecarver JL, Catral MS, Langnas AN. Transfusion induced graft versus host disease after liver transplantation. Documentation using polymerase chain reaction with HLA-DR sequence-specific primers. *Transplantation* 1994;58:269–71.
55. Klein C, Fraitag S, Foulon E, Raffoux C, Bodemer C, Blanche S. Moderate and transient transfusion-associated cutaneous graft-versus-host disease in a child infected by human immunodeficiency virus. *Am J Med* 1996;101:445–6.
56. Habesh A, Dalgeish AG, Hounsell EF. Absence of GVHD in AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;6:1224–7.
57. Otsuka S, Kunieda K, Kitamura F *i sur.* The critical role of blood from HLA-homozygous donors in fatal transfusion-associated graft-vs-host disease in immunocompetent patients. *Transfusion* 1991;31:260–4.
58. Takushi K, Shibata Y. Posttransfusion graft-vs-host disease in immunocompetent patients after cardiac surgery. *N Engl J Med* 1989;321:56.
59. Akahoshi M, Takanashi M, Masuda M *i sur.* A case of transfusion-associated graft-vs-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion* 1992;32:169–72.
60. Hayashi H, Nishiuchi T, Tamara H, Takeda K. Transfusion-associated graft-versus-host disease caused by leukocyte-filtered stored blood. *Anesthesiology* 1993;79:1419–21.
61. Pelszynski MM, Morof G, Luban ML, Taylor BJ, Quinones RR. Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation is assessed by limiting dilution analysis: implications for preventing transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood* 1994;83:1683–9.
62. BCSH. Blood Transfusion Task Force. Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfus Med* 1996;6:261–71.
63. Council of Europe Publishing. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 8<sup>th</sup> ed. 2002:70–1.
64. Gorlin JB, ed. Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 20<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 1999:30.
65. Asai T, Inaba S, Ohto H *i sur.* Guidelines for irradiation of blood and blood components to prevent post-transfusion graft-vs-host disease in Japan. *Transf Med* 2000;10:312–20.
66. Duguid JKM, Car R, Jenkins JA. Clinical evaluation of the effects of storage time and irradiation on transfused platelets. *Vox Sang* 1991;60:151–4.
67. Valerius NJ, Johansen KS, Nielsen OS. Effect of vitro X-irradiation on lymphocyte and granulocyte function. *Scand J Hematol* 1981;27:9–18.
68. Leitner GC, Neuhauser M, Weigel G *i sur.* Altered intracellular purine nucleotides in gamma-irradiated red blood cell concentrates. *Vox Sang* 2001;81:113–8.
69. Sproul AM, Chalmers EA, Mills KI, Burnerr AK, Simpson E. Third party mediated graft rejection despite irradiation of blood products. *Br J Haematol* 1992;80:251–2.
70. Juji T, Takahashi K, Shibata Y, Ide H, Sakakibara T, Ino T. Post-transfusion graft-versus-host disease in immunocompetent patients after cardiac surgery in Japan. *N Engl J Med* 1989;321:56.
71. Hato T, Yasukawa M, Takeuchi N. Decrease in transfusion associated graft-versus-host disease. *Transfusion* 1994;34:457.
72. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP *i sur.* Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101:2426–33.