



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pathogen inactivation in cellular blood products by photodynamic treatment

Trannoy, L.L.

Citation

Trannoy, L. L. (2010, May 12). *Pathogen inactivation in cellular blood products by photodynamic treatment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15371>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15371>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

HET INACTIVEREN VAN PATHOGENEN IN CELLULAIRE BLOED PRODUCTEN MET FOTODYNAMISCHE BEHANDELING

INTRODUCTIE: BLOEDPRODUCTEN EN ZIEKTEVERWEKKERS

De veiligheid van bloedtransfusie is een van de prioriteit van de bloedbank. Om veiligheid te garanderen is een reeks procedures geïmplementeerd. Ten eerste dient het doneren van bloed een vrijwillige, onbetaalde activiteit te zijn. Het donorbloed wordt vervolgens getest op de aanwezigheid van belangrijke ziekteverwekkers, zoals Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV), Human T-cell leucemia virus (HTLV) en *Treponema pallidum*.

In geïndustrialiseerde landen bedraagt de frequentie van geïnfecteerde bloeddonoraties ongeveer 1 op 270.000 voor HCV, 1 op 205.000 voor HBV en 1 op 3,1 miljoen voor HIV. De frequenties zijn nog veel lager voor HTLV en *Treponema palladium*.

Ondanks deze lage frequenties, kan het risico dat een geïnfecteerde bloeddonoratie aan een patiënt wordt overgedragen niet uitgesloten worden. Ten eerste komt het voor dat, wanneer een donor zeer recentelijk geïnfecteerd is, de ziekteverwekker nog niet detecteerbaar is in zijn bloed omdat de concentratie van het pathogeen of de hoeveelheid antilichamen tegen de ziekteverwekker nog te laag is. Ten tweede wordt de bloedvoorziening voortdurend bedreigd door nieuwe opkomende ziekteverwekkers, bijvoorbeeld het vogelgriep virus (H5N1) en het West-Nijl virus. Mensen reizen steeds meer en gaan steeds vaker naar tropische landen waar infecties zeer vaak voorkomen met parasieten, verantwoordelijk voor malaria of Chagas ziekte. Bovendien duurt het testen van bloeddonoraties op bacteriële contaminatie te lang om dit op tijd, dus voor de

transfusie, op te merken. Ten slotte is er niet voor alle bekende ziekteverwekkers een test beschikbaar.

Gezien het brede scala aan ziekteverwekkers is het niet realistisch om alle bloeddonaties op alle micro-organismen te testen. Dit zou leiden tot hogere kosten en langere verwerking van het bloed, wat uiteindelijk enorme gevolgen zou hebben voor de bloedvoorziening in ziekenhuizen.

Om de veiligheid van de bloedtransfusie te vergroten, zijn technieken ontwikkeld om ziekteverwekkers te inactiveren zonder dat de kwaliteit van het bloedproduct achteruit gaat. Zulke technieken worden "Pathogene Inactivatie Technieken" genoemd. Deze zijn vergelijkbaar met sterilisatietechnieken, met het grote verschil dat, bij sterilisatieprocessen alle componenten, inclusief de cellen, geïnactiveerd of vernietigd worden. Deze totale vernietiging is niet toepasbaar op cellulaire bloedproducten, omdat de bloedcellen noodzakelijk zijn voor het therapeutische effect van een bloedtransfusie. Om deze reden is binnen dit promotieonderzoek gewerkt aan een methode, waarmee met behulp van fotodynamische behandeling, specifiek de ziekteverwekkers in cellulaire producten worden geïnactiveerd.

HET PRINCIPE VAN FOTODYNAMISCHE BEHANDELING OM PATHOGENEN TE INACTIVEREN

De fotodynamische reactie betreft de activering van een lichtgevoelige molecuul (fotosensitizer) door belichting met rood licht in de aanwezigheid van zuurstof. Als de fotosensitizer eenmaal is geactiveerd, dan gaat deze chemische reacties aan met andere moleculen, waardoor zich zeer reactieve deeltjes vormen. Deze zeer reactieve toxische deeltjes zijn verantwoordelijk voor oxidatieve schade aan talloze moleculen die aanwezig zijn op virussen, bacteriën en bloedcellen. De eigenschappen van de fotosensitizer bepalen de effectiviteit en de selectiviteit van de fotodynamische behandeling (PDT voor PhotoDynamic Treatment).

DOEL VAN HET ONDERZOEK

In het onderzoek beschreven in dit proefschrift richtte onze pathogene inactivatie techniek zich voornamelijk op bloedproducten die rode bloedcellen bevatten

zoals rode bloedcel concentraten (RBC) en navelstrengbloed. Het doel van het onderzoek was een fotosensitizer te vinden waarmee micro-organismen geïnactiveerd worden zonder de bloedcellen te beschadigen. Alle bekende fotosensitizers die in staat waren om verschillende pathogenen te inactiveren, waren ook schadelijk voor de rode bloedcellen. In **hoofdstukken 2 en 3** hebben wij studies uitgevoerd met als doel meer inzicht te krijgen in het mechanisme achter de fotodynamische schade aan rode bloedcellen, wat vervolgens moest leiden tot het beter beschermen van deze cellen. De zoektocht naar meer specifieke fotosensitizers is beschreven in **hoofdstukken 4 en 5**. In **hoofdstukken 6 en 7** beschreven wij de toepassing van pathogene inactivering op navelstrengbloed en op witte bloedcellen.

SCHADE AAN RBC MEMBRAAN DOOR PDT MET DMMB EN SELECTIEVE BESCHERMING

In **hoofdstuk 2** wordt een studie beschreven naar het schadelijke effect van PDT met dimethyl-methylene blauw (DMMB) op de rode bloedcellen. DMMB is een fotosensitizer die bindt aan rode bloedcellen, waardoor de cellen direct blootgesteld worden aan de schadelijke effecten van de oxidatieve deeltjes. We hebben een eiwit, zogenaamd Band 3, geïdentificeerd waarop fotodynamische schade plaatstvindt. Band 3 transporteert anionen door het rode bloedcelmembraan. Als de activiteit van Band 3 verstoord is, kan de rode bloedcel zijn osmotische regulatie niet meer garanderen. De cellen zwellen op, waardoor ze vervolgens kapot gaan. Dit wordt hemolyse genoemd.

In **hoofdstuk 3** hebben wij een manier gevonden om Band 3 selectief te beschermen tegen fotodynamische schade door PDT met DMMB. Als Dipyridamole toegevoegd wordt aan het bloedproduct, is Band 3 beschermd tegen het schadelijke effect van PDT met DMMB. Dipyridamole is een molecuul dat aan Band 3 bindt en de schadelijke oxidatieve deeltjes vangt. Dipyridamole werkt eigenlijk als een schild en beschermt Band 3 zonder de inactivatie van virussen door PDT met DMMB te verminderen.

Helaas bleek echter dat PDT met DMMB ook op andere plekken van de rode bloedcellen schade aanricht, waardoor de kwaliteit van de rode bloedcellen zeer

moeilijk in stand te houden bleek. Vandaar dat wij op zoek zijn gegaan naar andere fotosensitizers.

DE ZOEKTOCHT NAAR EEN NIEUWE FOTOSENSITIZER: TRI-P(4)

In **hoofdstuk 4** is een reeks nieuwe fotosensitizers getest en geëvalueerd op hun potentieel om virussen te inactiveren. Tevens zijn hun effecten op de kwaliteit van de rode bloedcellen geëvalueerd. De nieuwe fotosensitizers bestaan uit derivaten van porfyrynes. Porphyrines zijn macrocyclische molecules (zeer grote cyclus) met vier pyrrole moleculen (fig.1). Van de 7 verschillende geteste porfyrynes, was Tri-P(4) de fotosensitizer die virussen het beste kon doden met beperkte schade aan rode bloedcellen. Tests in resusapen wezen uit dat de PDT-benhandelde rode bloecellen na transfusie net zoveel kans op overleving hadden als de onbehandelde cellen. Het vervolgonderzoek hierop is beschreven in **hoofdstuk 5**, waar PDT met Tri-P(4) getest werd op een breed scala aan micro-organismen die voornamelijk relevant zijn bij bloed transfusie. Deze studie heeft laten zien dat modelvirussen voor HCV, HBV en HIV geïnactiveerd konden worden. Echter PDT met Tri-P(4) scoorde onvoldoende bij het inactiveren van intracellulaire virussen en Parvo-virussen (waarvan de menselijke variant B19 veroorzaakt de vijfde ziekte, of anders genoemd erythema infectiosum). Parvo-virussen zijn bekend om hun hoge resistentie tegen chemische behandelingen. Bacteriën, vaak betrokken bij rode bloedcel contaminatie zoals *Yersinia enterocolitica*, waren ook gevoelig voor PDT met Tri-P(4). In vergelijking met DMMB, brengt Tri-P(4) minder schade toe aan rode bloedcellen. Desalniettemin leidt fotodynamische schade door Tri-P(4) toch tot een vermindering van de therapeutische kwaliteit van het bloedproduct.

Vanwege de al geringe kans op overdracht van micro-organismen via bloedtransfusie, blijkt de ontsmetting methode via PDT met Tri-P(4) geen toegevoegde waarde te hebben in het toenemen van de transfusionelle veiligheid. Dit vanwege de beperking van de behandeling om alle virussen te kunnen inactiveren en de schade, desondanks niet te verwaarlozen, aan de rode bloed cellen. Daarom is het besloten om deze techniek

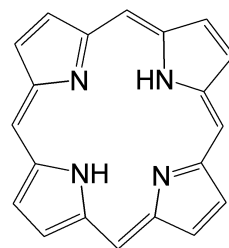


Figure 1: basische vorm van porphyrine

van pathogen inactivatie niet in te voeren voor de ontsmetting van rode bloed cel concentraten.

ONTSMETTING VAN NAVELSTRENGBLOED

Het gebruik van navelstrengbloed berust op een hoge concentratie bloedstamcellen, waardoor het een geschikt alternatief is voor beenmergtransplantatie, voornamelijk bij kinderen. De bloedstamcellen worden ook gekweekt voor nieuwe therapeutische doeleinden. Bij afname van het navelstrengbloed wordt het product vaak vervuild met bacteriën, wat gevaarlijk kan zijn voor de getransplanteerde patiënt en het kweken van de stamcellen zelf kan belemmeren.

Zoals beschreven in **hoofdstuk 6** inactieve PDT met Tri-P(4) alle bacteriën in vervuilde navelstrengbloedproducten. De stamcellen overleven deze ontsmettingsbehandeling. Helaas bleek uit studies in muizen dat de kwaliteit van het navelstrengbloed als transplantaat vermindert, waarschijnlijk doordat er toch fotodynamische schade aan de cellen plaatsvindt, die de cel migratie naar de beenmerg zou hebben aangetast. De stamcellen konden echter wel verder gekweekt worden tot andere bloedcellen, zoals thrombocyten. Doordat tijdens het kweken van deze cellen, het gebruik van antibiotica steeds bemoeilijkt wordt omdat bacteriën resistentie ontwikkelen tegen antibiotica, zou PDT met Tri-P(4) een interessante alternatieve behandeling zijn voor de ontsmetting van overige stamcel bevattende producten zoals de beenmerg en het menstruatiebloed. Met deze andere bronnen van stamcellen wordt onderzoek gedaan naar het herstel van weefsels en organen.

DE MODULATIE VAN HET IMMUUNSISTEEM MET PDT EN TRI-P(4)

In **hoofdstuk 7** is een studie beschreven naar het effect van PDT met Tri-P(4) op de witte bloedcellen die aanwezig zijn in rode bloedcelconcentraten. De transfusie van witte bloedcellen geeft bijwerkingen doordat het lichaam van de getransfundeerde patiënt als “vreemd” wordt herkend en aangevallen wordt door de witte bloedcellen van de donor. Een andere bijwerking is de aanmaak van antilichamen door de patiënt tegen de getransfundeerde witte bloedcellen. Zulke antilichamen kunnen problemen geven bij een latere bloedtransfusie.

Daarentegen, na een transplantatie (in het bijzonder niertransplantatie) bevordert de transfusie van witte bloedcellen de acceptatie van het transplantaat door het lichaam van de getransplanteerde patiënt.

Deze studie richtte zich op de bestudering van het effect van PDT met Tri-P(4) op het modulatiepotentieel van de witte bloedcellen. Onze resultaten laten zien dat PDT met Tri-P(4) het opwekken van de ontstekingsreacties remt. De sterkte van de remming is afhankelijk van de hoeveelheid rode bloedcellen die aanwezig zijn in het bloedproduct. De cellen werken als een schild tegen fotodynamische schade aan witte bloedcellen. De resultaten gaven sterke aanwijzingen dat de immune respons van donor witte bloedcellen gemoduleerd kon worden met PDT en Tri-P(4). Verder onderzoek is nodig om te bepalen of PDT met Tri-P(4) nieuwe ontwikkelingen zal brengen in het voorkomen van afstotingsreacties na orgaantransplantatie of het aanmaken van antilichamen na bloedtransfusie.

CONCLUSIE

Onze studies hebben laten zien dat de fotosensitizer Tri-P(4) veel beter is dan alle andere geteste fotosensitizers om pathogenen te inactiveren in rode bloedcelproducten. Echter, ondanks de veelbelovende resultaten van fotodynamische ontsmetting van rode bloedcelproducten, zou de resulterende therapeutische kwaliteit van het bloedproduct toch te veel reden voor bezorgdheid opleveren bij transfusiespecialisten. Vandaar dat verder onderzoek naar het gebruik van PDT met Tri-P(4) voor pathogene inactivatie in rode bloedcel concentraten niet voortgezet zal worden. Desalniettemin hebben onze studies verschillende toepassingen voor de fotodynamische behandeling met Tri-P(4) op bloed producten naar voren gebracht. De pathogeen inactiverende werking van Tri-P(4) zou wel gebruikt kunnen worden in andere bronnen van stamcellen zoals menstruatiebloed en beenmerg, gezien het geringe effect op stamcellen. Daarnaast zouden de effecten van de behandeling op de witte bloed cellen gunstig kunnen zijn om transfusiegerelateerde immune reacties te voorkomen of om tolerantie na orgaan- of celtransplantatie te bevorderen.