

## Eritrosit Süspansiyonlarının Depolanma Koşullarının T Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi\*

Hakan YILMAZ<sup>\*,1,2</sup>, Salih Haldun BAL<sup>\*,1,3</sup>, Diğdem YÖYEN-ERMİŞ<sup>\*,1</sup>,  
Gözde ARSLAN<sup>1,2</sup>, Fatma DOMBAZ<sup>1,2</sup>, Levent Tufan KUMAŞ<sup>3</sup>, Yasemin HEPER<sup>3,4</sup>,  
Haluk Barbaros ORAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>2</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp-İmmünoloji Anabilim Dalı, Bursa.

<sup>3</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dr. Raşit Durusoy Kan Merkezi, Bursa.

<sup>4</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

\* Yazarlar çalışmaya eşit katkı sağlamıştır.

### ÖZET

Önemli transfüzyon komplikasyonlarından biri olan transfüzyonla ilişkili immün düzenlenme (TRIM), allojenik kan transfüzyonunun (AKT) alıcının immün sisteminde yol açtığı değişiklikler olarak tanımlanabilir. En çok suçlanan etken, kan bileşeni içindeki mononükleer (MNH) hücrelerdir. Bu nedenle çalışmamızda eritrosit süspansiyonları (ES) içindeki T hücreler (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) hedeflenmiş, depolama koşullarının etkisiyle canlılık, proliferasyon ve aktivasyon düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Bu amaçla, üç adet kan bağışçısından alınan tam kanlardan ES'ler elde edilmiştir. Her kan bileşeninden tam kan örneği (5. saat) ve ES örnekleri (0, 7, 14, 21, 42. gün) elde edilmiştir. Ayrıca bağışçıdan bağış öncesi EDTA'lı tüplere alınan iki adet örnek de çalışmaya katılmıştır. Analizler bu örneklerden ayrıştırılan MNH kullanılarak yapılmıştır. Canlılık analizleri doğrudan MNH'ler, proliferasyon ve aktivasyon analizleri MNH kültürleri aracılığıyla akan hücre ölçerinde gerçekleştirilmiştir. Canlılık düzeylerinin depolama süresi ortalarında azalmaya başladığı, 42. gün ES örneklerinde hemen tamamen yok olduğu belirlenmiştir. T hücrelerin proliferasyon becerisi daha erken azalmış ve 21. gün ES örneklerinde kaybolmuştur. Aktivasyon belirteci düzeyleri MNH kültürünün sıfırıncı saatlerine göre 16 ve 72 saatlerde artış göstermiştir. Ayrıca bağışçıların yaşlarına göre de sonuçlarda belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak ES depolama süresi ve koşullarının etkisiyle ürün içindeki T lenfositlerin canlılığı ve proliferasyon becerileri azalmaktadır. Bu sonuçlar allojenik T lenfositlerin TRIM gelişimiyle ilişkilerinin düşük olabileceğini; T lenfosit aktivasyon kapasitelerinin ES'den uzaklaştıklarında artmış göstermesi eritrositlerin baskılayıcı özellik gösterebileceğini; TRIM gelişiminde bağışçı ve hasta yaşı gibi demografik parametrelerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Eritrosit süspansiyonu. Canlılık. Proliferasyon. İmmün düzenlenme. T lenfosit.

### The Effect of Storage Conditions of Erythrocyte Suspensions on T Cell Viability and Proliferation

### ABSTRACT

Transfusion-related immunomodulation (TRIM) can be defined as changes in the immune system of the recipient caused by allogeneic blood transfusion (ABT). The most commonly blamed agent is mononuclear (MNC) cells in the blood component. Therefore, T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) in erythrocyte suspensions (ES) were targeted in our study. The effect of storage conditions on viability, proliferation, and activation levels were analysed. ESs were obtained from whole bloods donated from three donors. Whole blood sample (5th hour) and ES samples (0, 7, 14, 21, 42nd day) were achieved from each blood component. Two samples taken from donors in EDTA tubes before donation were also included in the study. MNCs were isolated from these samples and analyses were performed with these cells by flow-cytometer. T-cell viability disappeared in the 42nd-day ES samples, whereas proliferation capacity was lost in the 21st-day ES samples. Activation marker levels increased at 16 and 72 hours compared to 0 hours MNH culture. Also, distinct differences were observed among results according to the ages of the donors. In conclusion, the viability and proliferation capacity of T lymphocytes in the ES decreases with the effect of storage time and conditions. These results suggest that the relationship between allogeneic T lymphocytes and the development of TRIM may be low; the increased activation capacity of T lymphocytes when they are removed from ES suggests that erythrocytes may show suppressive properties; and demographic parameters such as donor and patient age may also play a role in the development of TRIM.

**Keywords:** Erythrocyte suspension. Viability. Proliferation. Immunomodulation. T lymphocyte.

**Geliş Tarihi:** 15.Haziran.2023  
**Kabul Tarihi:** 24.Ağustos.2023

Dr. Haluk Barbaros ORAL  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp  
Fakültesi, İmmünoloji Anabilim  
Dalı, 16059, Görükle/Bursa.  
Tel: (533) 651 51 31  
E-posta: [oralb@uludag.edu.tr](mailto:oralb@uludag.edu.tr)

\* 15. Ulusal Kan Merkezleri ve  
Transfüzyon Tıbbı Kongresi'nde  
(Antalya, 30 Kasım-04 Aralık 2022)  
Sözlü Bildiri olarak sunulmuştur.

### Yazarların ORCID Bilgileri:

Hakan YILMAZ: 0000-0002-6684-8675  
Salih Haldun BAL: 0000-0002-6735-2305  
Diğdem YÖYEN-ERMİŞ: 0000-0001-5871-8769  
Gözde ARSLAN: 0000-0001-7225-0138  
Fatma DOMBAZ ÖZBEY: 0000-0001-7288-3250  
Levent Tufan KUMAŞ: 0000-0002-3947-0013  
Yasemin HEPER: 0000-0002-6635-5416  
Barbaros ORAL: 0000-0003-0463-6818

Transfüzyon, ciddi ve hayatı tehdit eden komplikasyonları nedeniyle çok riskli tıbbi uygulamalardan biri olarak kabul edilir. Bu komplikasyonlardan bir tanesi transfüzyonla ilişkili immün düzenlenmedir (Transfusion Related ImmunoModulation; TRIM). TRIM, allojeneik kan transfüzyonunun (AKT) transfüzyon alıcısının immün sisteminde yol açtığı düşünülen değişiklikleri kapsayan bir kavramdır. Diğer tüm transfüzyon komplikasyonlarında olduğu gibi kendisini bir belirti veya bir bulgu ile değil, klinik bir sonuç ile gösterir. İlk olarak 1970'lerin başlarında böbrek transplantasyonu bekleyen hastalara yapılan transfüzyonların graft ömrü üzerindeki olumlu etkilerinin gözlemlenmesiyle tanımlanmış<sup>1</sup>, AIDS pandemisine kadar AKT'nin böbrek transplantasyonu öncesi standart bir yaklaşım haline almasına neden olmuştur. Sonraki yıllarda yürütülen çalışmalarda AKT'nin, küratif cerrahi hastalarında tümör büyümesini ve metastaz gelişimini hızlandırdığı<sup>2</sup>, eşlerinden transfüzyon alan gebelerde spontan abortus olasılığını azalttığı<sup>3</sup>, Crohn hastalığı nedeniyle opere edilen hastalarda nüks sıklığını azalttığı<sup>4</sup>, fırsatçı enfeksiyonları<sup>5</sup> ve postoperatif bakteriyel enfeksiyonları artırdığı<sup>6</sup>, mortaliteyi ve yoğun bakımda yatış süresini uzattığı<sup>7</sup>, multi organ disfonksiyonuna yol açtığı<sup>8</sup>, mekanik ventilasyona bağlı kalma süresini uzattığı<sup>9</sup> öne sürülmüştür. Bunların dışında TRIM fenomenine odaklanmış çok sayıda araştırma bulunsa da, hiçbiri net olarak TRIM fenomeninin varlığını ve/veya şiddetini doğrulamak, altta yatan ana mekanizmayı açıklamak için yeterli olmamıştır. Ancak, AKT'nin alıcı immün sisteminde meydana getirdiği bazı değişiklikler tanımlanabilmiştir. AKT sonrası alıcıda Th1 yanıtının baskılanıp, Th2 yanıtının güçlendiği<sup>10</sup>, Treg gelişiminin uyarıldığı<sup>11</sup>, CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre sayıları ile CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> oranının azaldığı<sup>12</sup>, NK hücre fonksiyonlarının zayıfladığı<sup>13</sup>, monosit fonksiyonlarının bozulduğu<sup>14</sup> ve T ve B lenfositlerin proliferasyon becerilerinin baskılandığı<sup>15</sup> bildirilmiştir. Bu tabloya neden olan etkenlerin ise;

- Kan bileşeni içindeki allojeneik mononükleer hücreler (MNH)<sup>16-18</sup>
- Depolama koşullarının etkisiyle kan bileşeni içinde biriken biyolojik yanıt düzenleyiciler-immün mediyatörler (BYD-İM)<sup>16-18</sup>
- Çözünür peptitler (Sınıf I-HLA ve FasL vb)<sup>16-18</sup>
- Transfüze edilen kan bileşenin raf ömrü<sup>19</sup>
- Transfüze edilen bileşen sayısı<sup>20</sup> olduğu öne sürülmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak planlanan çalışmamızda iki soruya yanıt aranmıştır. Bunlar "AKT sonrası alıcıda meydana geldiği düşünülen değişiklikler kan torbası içinde başlıyor olabilir mi?" ve "Transfüze edilen kan bileşenin elde edilme süreci ve raf ömrü bu etkide rol oynuyor olabilir mi?" soruları olmuştur. İlk sorunun hedefi olarak da AKT sonrası T lenfosit

proliferasyonundaki baskılanma seçilmiş, öncelikli olarak bu etkinin kan torbası içinde başlayıp başlamadığı sorgulanmıştır. Bunun yanında T lenfositlerin canlılıkları ve aktivasyon belirteci ekspresyon düzeyleri de çalışmaya eklenmiştir. Böylece çalışmamız, eritrosit süspansiyonlarını (ES) elde etme süreci ve ES depolama koşullarıyla; ES içindeki T hücrelerin proliferasyon, aktivasyon ve canlılık düzeylerini ilişkilendirerek TRIM fenomeni hakkında kaynak oluşturacak bilgiyi üretmek amacıyla planlanmıştır.

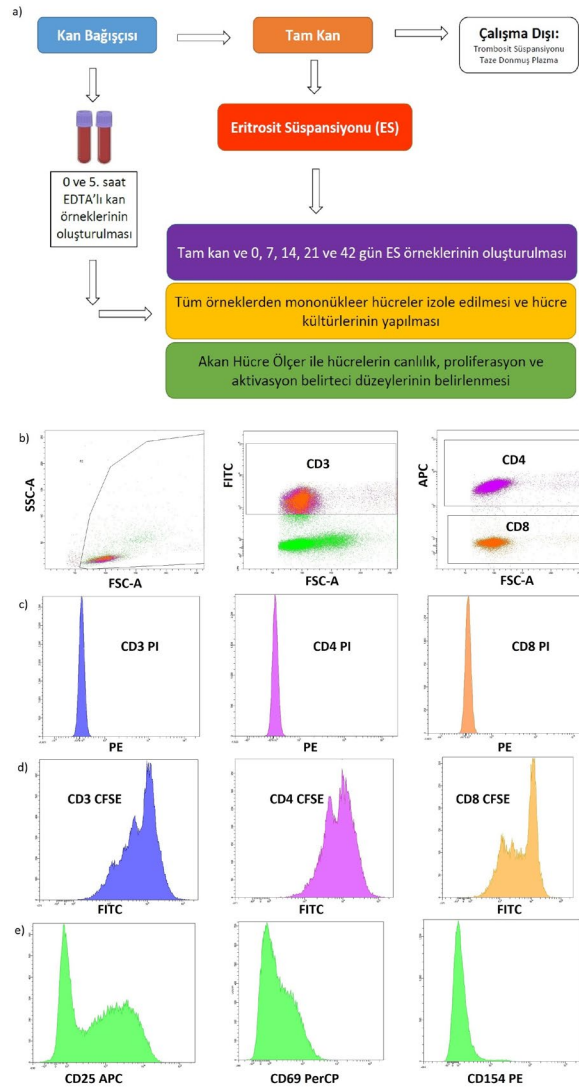
## Gereç ve Yöntem

Çalışmamız, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi (BUÜTF) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2022-16/70 numaralı onayıyla gerçekleştirilmiştir.

### Test örneklerinin elde edilmesi

Bu çalışma için BUÜTF Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi'nde ulusal bağışçı seçim kriterlerine uygun üç (3) adet gönüllü kan bağışçısından alınan örnek kanları ve kan bileşenleri kullanılmıştır. Bağışçıların üçü de erkektir ve ikisinin yaşı üçüncü dekatta, birinin yaşı altıncı dekattadır. Bağışçılardan önce 2x10 mL kan örneği (EDTA'lı tüp), sonra da bir ünite tam kan bağışı alınmıştır (Reveos 3 component blood bag, Terumo, Lakewood, CO, USA) (Şekil-1). EDTA'lı örneklerin birisi hemen, diğeri 5 saat sonra proliferasyon, canlılık ve aktivasyon testlerinde kullanılmıştır. Tam kanlar beş saat inkübatörde (Nüve, Ankara, Türkiye) oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra steril tüp birleştirme sistemi (TSCD-T, Terumo) yardımıyla transfer torbalara (Teruflex, Terumo) bir adet 10-15 mL'lik test örneği ayrılmış, örnek hemen proliferasyon, canlılık ve aktivasyon testlerinde kullanılmıştır. Örnek ayrıldıktan sonra tam otomatik kan işleme sistemi yardımıyla (Reveos, Terumo) bileşenlerine ayrılmıştır. Elde edilen ES'ler depolanmak üzere kan saklama dolaplarına (ALS, Angelantoni, Massa Martana, ITA) yerleştirilmiştir. Çalışmamızda kan bağışçılarından alınan iki adet EDTA'lı kan örneğinden, tam kan ve günü gelen ES torbalarından alınan örneklerden yararlanılmıştır (Şekil-1a). Bağışçıdan bağış öncesi alınan 0 saat örneği bağış öncesi durumu belirlemek; oda sıcaklığında 5 saat bekletilen EDTA'lı ve tam kan örnekleri arasındaki fark kan bağış sürecinin ve torbadaki koruyucu solüsyonun etkisini değerlendirmek; tam kan 5 saat ile ES 0 gün örnekleri arasındaki fark tam kandan bileşenlerin elde edilmesi aşamasında soğukta (+4°C) yapılan santrifügasyonun etkisini saptamak; 0, 7, 14, 21 ve 42 depolama günü ES örnekleri arasındaki farklar depolama süresinin ve koşullarının etkisini göstermek amacıyla çalışmamıza eklenmiştir. Tam kan örneklerinden bir tanesinde sorun yaşandığı ve yerine yenisi konmadığı için bu grup iki kişinin sonuçlarından oluşmaktadır.

## T Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu



### Şekil 1:

*Çalışma Protokolü. (a) Test örneklerinin elde ve test edilme algoritması, (b) Lökositlerin ve CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> hücreler için AHÖ kapılama stratejisinin representatif grafikleri, (c) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> hücrelerin canlılık analizinin representatif grafikleri, (d) CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> hücrelerin proliferasyon analizinin representatif grafikleri, (e) Aktivasyon belirteci analizinin representatif grafikleri.*

### Canlılık analizi

Kan örneklerinden dansite gradiyent yöntemiyle Ficoll 1.077g/mL (Capricorn Scientific, Germany) MNH'ler izole edildi. Elde edilen MNH'ler akım sitometri tüplerine 100'er µl eklendikten sonra üzerlerine florokrom işaretli anti-CD3 FITC (Beckman Coulter, USA) ve anti-CD4 APC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) monoklonal antikor (mAb) eklendi. 40 dakikalık inkübasyondan sonra 2mL PBS (Euroimmun, Germany) eklenerek 2000 rpm'de 5

dakikalık santrifügasyonla (NF 800R, Nüve) yıkama işlemi yapıldı. Ardından 1µL Propidium Iodide (PI) (BioLegend, San Diego, CA, USA) eklendi. 10 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 150 µL PBS içinde süspansiyon edilerek akan hücre ölçerde (AHÖ) (FACS ARIA III, BD Biosciences) değerlendirildi (Şekil-1b, -1c).

### Proliferasyon analizi

Proliferasyon testi canlılık düzeyi %20'den düşük olan örneklerde çalışılmadı. Çalışılacak örneklerden dansite gradiyent yöntemiyle (Ficoll 1.077g/mL) MNH'ler izole edildikten sonra hücreler 1mL cRPMI 1640 [L-glutamin içeren RPMI 1640 (Biowest, France); %10 v/v FBS (Biowest); %1 v/v penisilin/streptomisin (Biowest)] ile süspansiyon edildi. Thoma lamıyla süspansiyondaki hücre sayısı belirlendi. Sonraki tüm işlemler CFSE'nin ışıktan etkilenmemesi için karanlık ortamda gerçekleştirildi. MNH'lere final konsantrasyonu 1µM olacak şekilde carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Biolegend, USA) eklendi. 15 dakikalık inkübasyon (Panasonic, MCO-170AC, PCH, Netherlands) sonunda soğuk cRPMI 1640 eklenerek 5 dakika daha inkübe edilen örnekler 2000 rpm'de 5 dakika santrifügasyonla iki kez yıkandı. Sonrasında 2 mL hacimde 2x10<sup>6</sup> MNH olacak şekilde cRPMI 1640 ile süspansiyon edildi. Kültür pleytinde 200 µL'lik unstimule ve stimule kuyucuklar oluşturuldu. Stimulasyon için kuyucuklara 10<sup>5</sup> hücre başına 1 µL olacak şekilde (2 µL) phytohemagglutinin (PHA) (Sigma, USA) eklendi. Kültür pleytleri 96 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>'de inkübasyonda bekletildi. İnkübasyonun sonunda kuyulardaki hücreler AHÖ tüplerine toplandı. Üzerlerine 2 mL PBS eklendikten sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifügasyonla yıkandı ve 100µL PBS ile süspansiyon edildi. Süspansiyonun üzerine florokrom işaretli anti-CD3 PE (Beckman Coulter) ve anti-CD4 APC mAb (BD Biosciences) eklendi. 40 dakikalık inkübasyondan sonra 2mL PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dakikalık santrifügasyonla yıkama işlemi yapıldı. Ardından pellet 250 µL PBS içinde süspansiyon edilerek AHÖ'de değerlendirildi (Şekil-1b, -1d).

### Aktivasyon belirteçlerinin değerlendirilmesi

Aktivasyon belirteçleri canlılık düzeyi %20'den düşük olan örneklerde çalışılmadı. Çalışılacak örneklerden dansite gradiyent yöntemiyle (Ficoll 1.077g/mL) MNH'ler izole edildikten sonra Thoma lamında sayıları belirlendi. Sıfırıncı saat aktivasyonu için RPMI ile 16 ve 72 saat aktivasyonları için cRPMI ile 1.10<sup>6</sup> MNH/mL'lik süspansiyonlar hazırlandı. Sıfırıncı saatte aktivasyon belirteçleri AHÖ'de hemen değerlendirilirken, 16 ve 72 saatler için kültür pleytinde 200 µL'lik unstimule ve stimule kuyucuklar oluşturuldu. Stimulasyon için kuyucuklara ikişer µL PHA eklendi. Kültür pleytleri 16 ve 72 saat boyunca

37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>'de inkübasyonda bekletildi. İnkübasyonun sonunda ilgili kuyulardaki hücreler AHÖ tüplerine toplandı. Üzerlerine 2 mL PBS eklendikten sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifügasyonla yıkandı ve 100µL PBS ile süspansiyon edildi. Süspansiyonun üzerine florokrom işaretli anti-CD25 APC, anti-CD69 PerCP ve anti-CD154 PE mAb'lar (BD Biosciences) eklendi. 40 dakikalık inkübasyondan sonra 2mL PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dakikalık santrifügasyonla yıkama işlemi yapıldı. Ardından pellet 250 µL PBS içinde süspansiyon edilerek AHÖ'de değerlendirildi (Şekil-1e).

### Biyoistatistiksel Analiz

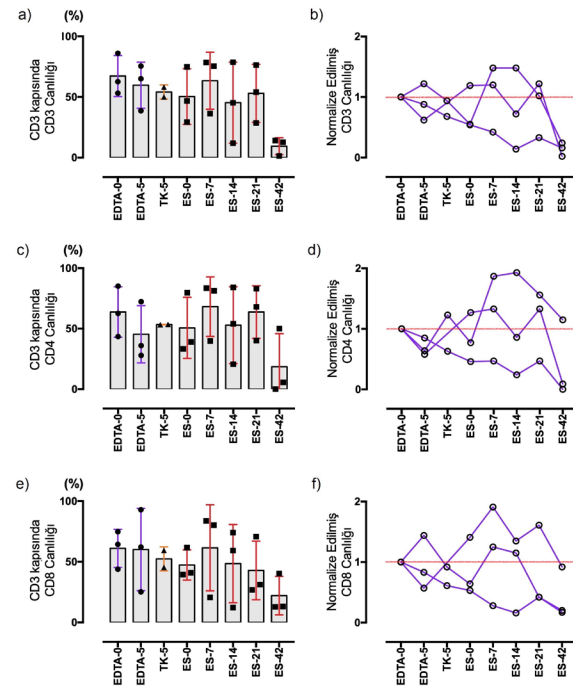
PI ve CFSE sonuçlarının normalizasyonu için, EDTA'lı 0 saat örneklerinin düzeyleri "%100" kabul edilmiş ve diğer örneklerin düzeyleri bu düzeye oranlanmıştır. Aktivasyon belirteçleri için bu hesaplama "%100" kabul edilen 0 saat örneklerinin düzeyine göre 16 ve 72 saat örneklerinin düzeylerinin oranlanmasıyla yapılmıştır. İstatistiksel analizler hem ham veriler hem de normalize veriler ile ayrı ayrı yapılmıştır. Karşılaştırmalı analizler için One-way ANOVA testinden, multi korelasyon analizi için Pearson R testinden yararlanılmıştır. Korelasyon analizinde normalize edilmiş veriler kullanılmamıştır. 0,05'den küçük *p* değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### Bulgular

CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lenfositlerin canlılığının bağış öncesi alınan 0 saat örneğine göre EDTA'lı 5 saat, tam kan 5 saat ve ES 0 gün örneklerinde azaldığı belirlenmiştir (Şekil-2a, 2c, 2e). ES 0 gün örneklerine göre 7, 14 ve 21 gün örneklerinde azalma gözlenmezken; 42 gün örneklerinde T lenfosit canlılığı büyük oranda azalmıştır (Şekil-2a, 2c, 2e). Bağışçılar arasında T hücre canlılığı açısından belirgin farklılıklar gözlenirse de ES 7 gün örneklerinden sonra hemen tüm bağışçıların CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> hücrelerinin canlılığı azalmıştır (Şekil-2b, 2d, 2f). Ancak istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır.

CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lenfositlerin proliferasyon analizinde, EDTA'lı tüplere alınan 0 ve 5 saatlik örnekler arasında belirgin bir fark saptanmamıştır. Proliferasyon kapasitesi tam kan örneklerinde EDTA'lı örneklere belirgin biçimde azalırken; ES 0 gün örneklerinde tam kan örneklerine göre artış göstermiştir (Şekil-3a, 3c, 3e). Bu artış daha çok CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> hücrelerde görülmüştür (Şekil-3b, 3d, 3f). Bağışçılardan bir tanesinde T hücre canlılığı %20'nin altına düştüğü için ES 7 gün örneklerinden itibaren sadece iki bağışçı için proliferasyon testi çalışılmıştır. Bu bağışçı örneklerinden bir tanesinde 7 gün örneğinde, diğerinde 21 gün örneğinde

proliferasyon tam anlamıyla baskılanmıştır. Bağışçılar arasında T hücrelerin proliferatif kapasitesi açısından belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Bir bağışçıya ait lenfositlerin proliferasyon becerisi hemen tüm örneklerde EDTA'lı 0 saat örneğine göre artış gösterirken; diğer iki bağışçının hücreleri çoğu örnekte bu düzeyin altında kalmıştır (Şekil-3b, 3d, 3f). Proliferasyon analizlerinde istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır.



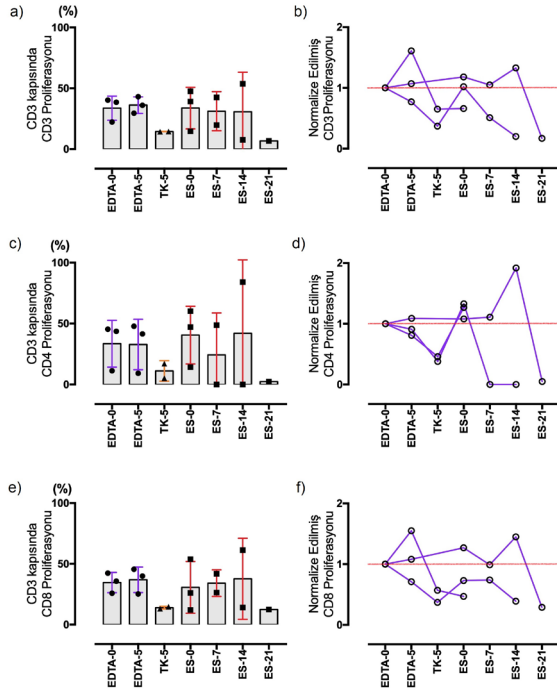
### Şekil 2:

*T hücrelerin canlılık düzeyleri. (a) CD3+hücrelerin canlılık düzeyleri, (b) CD3+hücrelerin normalize edilmiş canlılık düzeyleri, (c) CD3+CD4+hücrelerin canlılık düzeyleri, (d) CD3+CD4+hücrelerin normalize edilmiş canlılık düzeyleri, (e) CD3+CD8+hücrelerin canlılık düzeyleri, (f) CD3+CD8+hücrelerin normalize edilmiş canlılık düzeyleri. TK: Tam Kan, ES: Eritrosit Süspansiyonu.*

CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ve CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lenfositlerin aktivasyon belirteci ekspresyon düzeyleri 0 ve 5 saat EDTA'lı tüplerde, 5 saat tam kan örneğinde ve 0 gün ES örneğinde belirlenebilmiştir. Tüm örneklerdeki CD25, CD69 ve CD154 düzeyleri 0 saate göre 16 ve 72 saat kültürlerinde artış göstermiştir (Şekil-4a-f). Sadece tam kan örneğinin 16 saatlik kültüründe CD154 düzeyinde azalma saptanmıştır (Şekil-4e). Örneklerin büyük bölümünde CD25 ve CD154 düzeyleri 16 saate göre 72 saat kültürlerinde artarken, CD69 düzeyleri 0 saat EDTA'lı örnek dışında kalan örneklerde 72 saat kültürlerinde azalma göstermiştir (Şekil-4d). Normalize edilmiş sonuçlara göre analiz yapıldığında aktivasyon belirteci düzeylerinin 0 saat

## T Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu

örneklerine göre 16 ve 72 saatlik kültürlerde düzeylerini artırdığı belirlenmiştir (Şekil-4b, 4d, 4f). Ancak bir bağışçının hücrelerinin EDTA'lı 5 saat örneğinin 72 saatlik kültürü dışında 0 saatlere göre tüm örneklerde, CD154 düzeyini yitirdiği gözlenmiştir (Şekil-4f). İstatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanmamıştır.

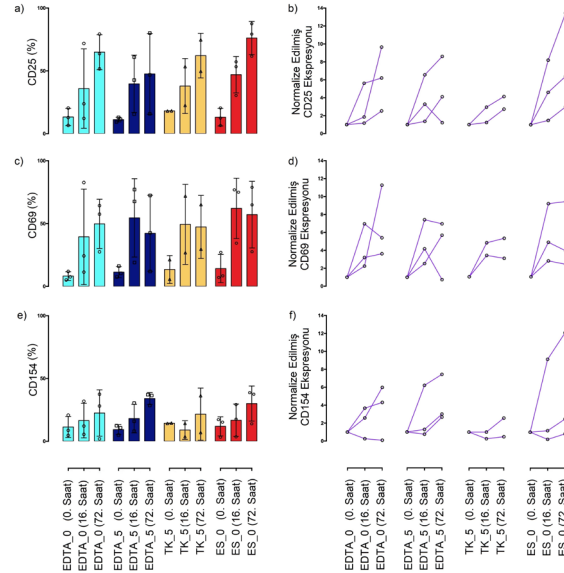


**Şekil 3:**

*T hücrelerin proliferasyon düzeyleri. (a) CD3+ hücrelerin proliferasyon düzeyleri, (b) CD3+ hücrelerin normalize edilmiş proliferasyon düzeyleri, (c) CD3+CD4+ hücrelerin proliferasyon düzeyleri, (d) CD3+CD4+ hücrelerin normalize edilmiş proliferasyon düzeyleri, (e) CD3+CD8+ hücrelerin proliferasyon düzeyleri, (f) CD3+CD8+ hücrelerin normalize edilmiş proliferasyon düzeyleri. TK: Tam Kan, ES: Eritrosit Süspansiyonu.*

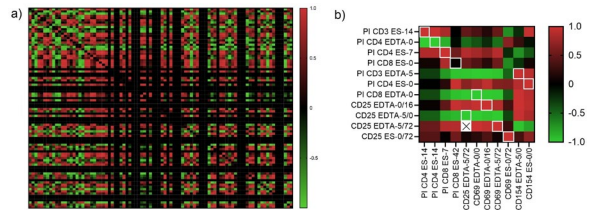
ES 14 gün örneklerinde CD3<sup>+</sup> ve CD4<sup>+</sup> hücrelerin ( $p=0,020$ ), ES 7 gün örneklerinde CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücrelerin ( $p=0,003$ ), ES 0 ve 42 gün örneklerinde CD8<sup>+</sup> hücrelerin ( $p=0,035$ ) canlılık düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (Şekil-5b). CD25 ile CD69 arasında üç farklı örnekte pozitif korelasyon bulunmuştur. EDTA 0 saat örneğinin 16 saatlik kültüründe ( $p=0,009$ ), EDTA 5 saat örneğinin 72 saatlik kültüründe ( $p=0,019$ ) ve ES 0 gün örneğinin 72 saatlik kültüründe ( $p=0,030$ ) bu iki belirteç arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (Şekil-5b). Ayrıca EDTA 0 saat ve ES 14 gün örneklerinde CD4<sup>+</sup> hücrelerin ( $p=0,012$ ) canlılık düzeyleri arasında; EDTA 0 saat örneklerinde CD8<sup>+</sup> hücrelerin canlılık

düzeyleri ile CD69 düzeyleri arasında ( $p=0,022$ ) ve EDTA 5 saat örneğinin 0 ve 72 saatlik kültürlerinde CD25 düzeyleri arasında ( $p=0,036$ ) negatif korelasyon belirlenmiştir (Şekil-5b).



**Şekil 4:**

*T hücrelerin aktivasyon belirteci düzeyleri. (a) CD25 ekspresyon düzeyleri, (b) Normalize edilmiş CD25 ekspresyon düzeyleri, (c) CD69 ekspresyon düzeyleri, (d) Normalize edilmiş CD69 ekspresyon düzeyleri, (e) CD154 ekspresyon düzeyleri, (f) Normalize edilmiş CD154 ekspresyon düzeyleri. TK: Tam Kan, ES: Eritrosit Süspansiyonu.*



**Şekil 5:**

*Multi-korelasyon analizi sonuçları. (a) Tüm verinin birbirine korelasyon analizi sonuç grafiği, (b) Birbiri ile ilişkili olabilecek parametrelerin korelasyon analizi sonuç grafiği. İlişkilendirilen parametrelere ait sonuçlar beyaz kare ile CD25 EDTA-5/72 örnekleri arasında analiz yapılamadığı için sonuç kutucuğu [X] ile işaretlenmiştir.*

## Tartışma ve Sonuç

Bu güne kadar merkezimizde yürütülen TRIM ile ilişkili çeşitli çalışmaların ilkinde AKT sonrası alıcıda meydana geldiği düşünülen bazı immünolojik değişikliklerin kan bileşeni içinde başlayıp



başlamadığı incelenmiştir. Bu çalışmada ES içinde kalan CD4<sup>+</sup> T hücrelerin IFN- $\gamma$  salgılayanlarının depolama sürecinde düzeylerini kaybettiği, IL-4 ve IL-5 salgılayanların düzeylerinin arttığı belirlenmiştir<sup>21</sup>. Bu sonuç AKT alıcısında meydana geldiği düşünülen Th2 polarizasyonu ile uyumlu bir sonuç olmuştur<sup>10</sup>. Bir diğer çalışmamızda ES içindeki CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre sayılarına ve CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> oranına odaklanılmıştır<sup>22</sup>. Bu çalışmamızda da ES içindeki CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre sayılarının depolama sürecinde azaldığı, ama CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> oranının ise artış gösterdiği saptanmıştır. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> hücre sayılarındaki azalma AKT sonrası alıcılarda saptanan azalma ile uyumlu olsa da, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> oranında zıt bir sonuca ulaşılmıştır<sup>12</sup>. Bu iki çalışma depolama koşulları ve süresinin etkisini önce ES içinde göstermeye başladığını düşündürmüştür. Bu nedenle, bu çalışmada AKT alıcısında geliştiği varsayılan T lenfositlerin proliferasyon becerilerindeki baskılanmanın<sup>15</sup> ES içinde başlayıp başlamadığı araştırılmıştır. Aynı zamanda T lenfositlerin canlılık ve aktivasyon düzeyleri de incelenmiştir.

Çalışmamızda ES içindeki lenfositlerin canlılıklarını 42. depolama gününde neredeyse tamamen kaybettikleri saptanmıştır (Şekil-2). Kan bağışçısındaki canlılık düzeyine göre (EDTA-0) diğer günlerde küçük dalgalanmalar saptansa da, 42. günde saptanan azalma dramatiktir. Sağlıklı kişilerden alınmış kanlardan izole edilmiş ve soğukta (+4°C) bekletilmiş MNH'ler içindeki T hücre canlılığının saatler ve günler içinde azaldığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir<sup>23,24</sup>. Çalışmamızda bu etkinin baskın olarak 42 gün sonra görülmesi ES içindeki ek solüsyonun (SAG-M) koruyucu etkisi olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda bağışçılar arasında da belirgin farklılıklar saptanmıştır. Altıncı dekattaki bağışçının hücreleri bağışçının dolaşımından ayrıldıktan sonra kararlı biçimde canlılıklarını yitirirken, diğer iki bağışçının hücreleri belirgin canlılık kayıplarını 21. günden sonra yaşamıştır (Şekil-2b, 2d, 2f). Bu da hücre canlılığı ile bağışçı yaşı arasında ilişki olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda ES içindeki lenfositlerin proliferasyon becerilerini 21. depolama gününde kaybettikleri saptanmıştır (Şekil-3). İlk olarak tam kan örneklerinde belirgin bir baskılanma saptanmıştır. Sıfırıncı gün ES örneklerinde proliferasyon yeteneği büyük ölçüde geri kazanılsa da 21 gün sonunda tamamen yok olmuştur. Soğuğa daha duyarlı hücrelerin tam kan santrifügasyonu sırasında en başta ölmesinin bu sonucun nedeni olduğu düşünülmüştür. Bu sonuç santrifügasyon sonrası canlı kalan hücrelerin kısa bir süreliğine proliferasyon olabildikleri, ama depolama koşul ve süresinin etkisiyle bu özelliklerini kaybetme eğiliminde oldukları şeklinde yorumlanmıştır. Bağışçılar arasında proliferasyon açısından da farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil-3b, 3d, 3f).

Altıncı dekattaki bağışçının hücreleri ES'lerin 0. gün örneklerinde proliferasyon yeteneğini kaybederken, diğer iki bağışçıda baskılanma 14 ve 21 depolama günlerinde gerçekleşmiştir. ES'lerde saptadığımız bu baskılanmanın çeşitli nedenleri olabilir. Apoptoza uğrayan nötrofillerden açığa çıkan ekstraselüler veziküllerin (EV) T hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir<sup>25</sup>. ES içinde ilk depolama günlerinde apoptoza giden nötrofillerden açığa çıkan EV'lerin rolü olabilir. Kan bileşeni süpernatantının TGF- $\beta$  aracılığıyla T hücre proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir<sup>26</sup>. Ürün süpernatantı kendi T hücrelerini de baskılıyor olabilir. Uzun süre depolanmış eritrositlerin CD4, CD8 proliferasyonunu baskıladığı, baskılanmanın taze ve depolanmamış eritrositler ile görülmediği bildirilmiştir<sup>15</sup>. Eritrositlerin temas aracılı olarak T hücre proliferasyonunu ve mitojenlere yanıtını baskıladığı farklı iki çalışma ile gösterilmiştir<sup>27,28</sup>. Ürün içindeki baskılanmanın nedeni bağışçının kendi eritrositleri de olabilir çünkü temas aracılı baskılama otolog eritrositlerle de meydana gelmiştir<sup>28</sup>. Baskılayıcı fenotipin depolama sürecinde kazanıldığı, baskılanmanın eritrosit dozuna ve depolama süresine bağlı olarak arttığı bildirilmiştir<sup>28</sup>. Ek olarak kan bileşeni içindeki T lenfositlerinin mixed lymphocyte reactivity (MLR) becerisini 4°C'da, 4 günde geri dönüşsüz şekilde kaybettiği gösterilmiştir<sup>29</sup>. Bulgularımız ve bu çalışmaların sonuçları, AKT sonrası alıcıda T lenfosit proliferasyonunun baskılanmasına, neden olan faktörlerin etkilerini önce ES içerisinde gösterdiğini düşündürmektedir. ES içine başlayan, canlılık ve proliferasyon yeteneği kaybı, allojeneik T lenfositlerin ya TRIM gelişimine katılmadıklarını ya da taze olanların bu etkide rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle TRIM gelişiminde daha çok kan bileşeni içindeki diğer faktörlerin rol oynadığını düşünmek mümkündür. T lenfositler üzerindeki baskılayıcı bu etkiyi meydana getirebilecek süpernatanda biriken BYD-İM'ler, EV'ler, çözünür peptitler ve eritrositler gibi faktörler aynı etkiyi AKT sonrası hastada da oluşturabilirler. Özellikle eritrositlerin depolama sürecinde kazandığı baskılayıcı özellik, uzun süre depolanmış ES'lerle TRIM arasındaki ilişkisinin nedenlerinden olabilir<sup>30-33</sup>.

Aktivasyon belirteci düzeyleri (CD25, CD69, CD154) EDTA-0, EDTA-5, TK-5 ve ES-0 örneklerinde sıfırıncı saatlere göre 16 ve 72 saatlerde artış göstermiştir. Bu sonuç T hücrelerin kan torbası içindeki eritrositlerin baskılayıcı etkisinden kurtulduklarında aktive olabildiklerini düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada CD4<sup>+</sup> T hücrelerin uyarıldıklarında CD25 ve CD69 ekspresyonlarının arttığı; aynı T hücrelerin eritrositlerle eş-kültürü yapıldığında aynı aktivasyon belirteci düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir<sup>34</sup>. Bu sonuca T hücrelerle eritrositlerin doğrudan temaslarının yol açtığı

## T Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu

gösterilmiş ve baskılamanın reaktif oksijen ürünlerinin düzeyiyle (reactive oxygen species; ROS) ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>34</sup>. Çalışmamızda saptanan sonuçlar da bu durumla ilişkili olabilir. EDTA-0, EDTA-5, TK-5 ve ES-0 örnekleri içinde eritrositlerle temas halinde olan T hücrelerin sıfırıncı saat aktivasyon belirteci düzeylerinin düşük olması ve MNH kültür ortamında uyarıldıktan sonraki 16 ve 72 saatlerde düzeylerinin artış eğilimi göstermesi eritrositlerin baskılayıcı özelliklerinin sonucu olabilir. Ayrıca korelasyon analizi sonucunda CD25 ile CD69 ekspresyonunun paralellik gösterdiği, CD154 ekspresyonu ile korelasyonlarının olmadığı görülmüştür. CD154 ekspresyon artışlarının 0 saatlere göre 16 ve 72 saatlerde CD25 ve CD69'daki kadar olmaması da eritrosit temasından sonra uyarıma diğerleri kadar iyi yanıt vermediğini düşündürmüştür.

Bunlara ek olarak sonuçlarımız yaş faktörünün de TRIM gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Hücre canlılığı, proliferasyon becerisi ve aktive olma kapasitesi açısından altıncı dekattaki bağışçı ile diğer iki bağışçı arasında belirgin bir farklılık gözlemlenmiştir. Bağışçı yaşı kadar, AKT alıcısının yaşı da bunda etkili olabilir. Ancak bu görüşü tartışabilmek için yeterli sayıda bağışçı ve alıcı ile yapılacak çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak ES depolama süresi ve koşullarının etkisiyle ürün içindeki T lenfositlerin canlılığı ve proliferasyon becerileri azalmaktadır. Bu da allojenik T lenfositlerin TRIM gelişimiyle ilişkilerinin düşük olasılıklı olduğunu düşündürmektedir. T lenfosit aktivasyon kapasitelerinin eritrositlerden uzaklaşınca artmış göstermesi TRIM-eritrosit ilişkisinin daha iyi değerlendirilmesi gerektiğinin işareti olabilir. Ek olarak TRIM çalışmalarında örneklem gruplarının donör ve hasta yaşı gibi demografik parametreleri de değerlendirecek şekilde yapılandırılmasında yarar vardır.

### Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
Onay Tarihi: 08.11.2022  
Karar No: 2022-16/70

### Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: H.Y., S.H.B., D.Y.E.; Veri toplama ve işleme: H.Y., D.Y.E., G.A., F.D.; Analiz ve verilerin yorumlanması: H.Y., S.H.B., D.Y.E., L.T.K., H.B.O.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: S.H.B., Y.H., H.B.O.

### Destek ve Teşekkür Beyanı:

Makale Yazarlarının destek ve teşekkür beyanı yoktur.

### Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

## Kaynaklar

1. Opelz G, Sengar DP, Mickey MR, Terasaki PI. Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. *Transplant Proc* 1973;5(1):253-9.

- Gantt CL. Red blood cells for cancer patients. *Lancet* 1981;2(8242):363.
- Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, et al. Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet* 1985;1(8435):941-3.
- Peters WR, Fry RD, Fleshman JW, Kodner IJ. Multiple blood transfusions reduce the recurrence rate of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1989;32(9):749-53.
- Sloand E, Kumar P, Klein HG, Merritt S, Sacher R. Transfusion of blood components to persons infected with human immunodeficiency virus type 1: relationship to opportunistic infection. *Transfusion* 1994;34(1):48-53.
- Chang H, Hall GA, Geerts WH, et al. Allogeneic red blood cell transfusion is an independent risk factor for the development of postoperative bacterial infection. *Vox Sang* 2000;78(1):13-8.
- Kneyber MCJ, Hersi MI, Twisk JWR, Markhorst DG, Plötz FB. Red blood cell transfusion in critically ill children is independently associated with increased mortality. *Intensive Care Med* 2007;33(8):1414-22.
- Gauvin F, Spinella PC, Lacroix J, et al. Association between length of storage of transfused red blood cells and multiple organ dysfunction syndrome in pediatric intensive care patients. *Transfusion* 2010;50(9):1902-13.
- Kneyber MCJ, Grotenhuis F, Berger RFM, et al. Transfusion of leukocyte-depleted RBCs is independently associated with increased morbidity after pediatric cardiac surgery. *Pediatr Crit Care Med* 2013;14(3):298-305.
- Zhu X, Yu B, You P, et al. Ubiquitin released in the plasma of whole blood during storage promotes mRNA expression of Th2 cytokines and Th2-inducing transcription factors. *Transfus Apher Sci* 2012;47(3):305-11.
- Baumgartner JM, Silliman CC, Moore EE, Banerjee A, McCarter MD. Stored red blood cell transfusion induces regulatory T cells. *J Am Coll Surg* 2009;208(1):110-9.
- Chen G, Zhang F jiang, Gong M, Yan M. Effect of perioperative autologous versus allogeneic blood transfusion on the immune system in gastric cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8(8):560-5.
- Ghio M, Contini P, Negrini S, et al. Down regulation of human natural killer cell-mediated cytotoxicity induced by blood transfusion: role of transforming growth factor-β(1), soluble Fas ligand, and soluble Class I human leukocyte antigen. *Transfusion* 2011;51(7):1567-73.
- Muszynski JA, Bale J, Nateri J, et al. Supernatants from stored red blood cell (RBC) units, but not RBC-derived microvesicles, suppress monocyte function in vitro. *Transfusion* 2015;55(8):1937-45.
- Long K, Meier C, Ward M, et al. Immunologic profiles of red blood cells using in vitro models of transfusion. *J Surg Res* 2013;184(1):567-71.
- Bal SH, Oral HB. Transfusion-related immunomodulation. *Turkish J Immunol* 2016;4(3):37-46.
- Nascimento JEA do, Zampieri-Filho JP, Bordin JO. Implications of perioperative allogeneic red blood cell transfusion on the immune-inflammatory response. *Hematol Transfus Cell Ther* 2021;43(1):58-64.
- Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related immunomodulation (TRIM): An update. *Blood Rev* 2007;21(6):327-48.
- Cholette JM, Pietropaoli AP, Henrichs KF, et al. Longer RBC Storage Duration Is Associated With Increased Postoperative Infections in Pediatric Cardiac Surgery. *Pediatr Crit Care Med* 2015;16(3):227-35.
- Rodieck W, Hallensleben M, Robert J, et al. Impact of perioperative blood transfusions on postoperative renal function and survival after resection of colorectal liver metastases. *World J Surg Oncol* 2022;20(1):100.

21. Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, et al. Effect of storage period of red blood cell suspensions on helper T-cell subpopulations. *Blood Transfus* 2018;16(3):262–72.
22. Bal SH, Kumaş LT, Heper Y, et al. Impact of Storage Period on CD4 + /CD8 + T Lymphocyte Ratio in Erythrocyte Suspensions Eritrosit Süspansiyonlarında Depolanma Sürecinin CD4 + /CD8 + T Lenfositleri Oranı Üzerine Etkisi. *Turk J Immunol* 2020;8(2):44–9.
23. Belloni P, Meschini R, Palitti F. Effects of storage conditions of human whole blood on the viability of lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 2008;84(7):613–9.
24. Jerram A, Guy TV, Beutler L, et al. Effects of storage time and temperature on highly multiparametric flow analysis of peripheral blood samples; implications for clinical trial samples. *Biosci Rep* 2021;41(2).
25. Shen G, Krienke S, Schiller P, et al. Microvesicles released by apoptotic human neutrophils suppress proliferation and IL-2/IL-2 receptor expression of resting T helper cells. *Eur J Immunol* 2017;47(5):900–10.
26. Hodge GL, Hodge SJ, Nairn J, et al. Poststorage leuko-depleted plasma inhibits T-cell proliferation and Th1 response in vitro: characterization of TGFbeta-1 as an important immunomodulatory component in stored blood. *Transplantation* 2005;80(1):95–101.
27. Bernard A, Meier C, Ward M, et al. Packed red blood cells suppress T-cell proliferation through a process involving cell-cell contact. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 2010;69(2):320–7.
28. Long K, Meier C, Bernard A, et al. T-cell suppression by red blood cells is dependent on intact cells and is a consequence of blood bank processing. *Transfusion* 2014;54(5):1340–7.
29. Chang H, Voralia M, Meenakshi B, Sher GD, Branch DR. Irreversible loss of donor blood leucocyte activation may explain a paucity of transfusion-associated graft-versus-host disease from stored blood. *Br J Haematol* 2000;111(1):146–56.
30. Goel R, Johnson DJ, Scott AV, et al. Red blood cells stored 35 days or more are associated with adverse outcomes in high-risk patients. *Transfusion* 2016;56(7):1690–8.
31. Rapido F, Brittenham GM, Bandyopadhyay S, et al. Prolonged red cell storage before transfusion increases extravascular hemolysis. *J Clin Invest* 2017;127(1):375–82.
32. Atzil S, Arad M, Glasner A, et al. Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes. *Anesthesiology* 2008;109(6):989–97.
33. Hod EA, Zhang N, Sokol SA, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood* 2010;115(21):4284–92.
34. Gerner MC, Bileck A, Janker L, et al. Packed red blood cells inhibit T-cell activation via ROS-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 2021;296:100487.