

Transfusion-associated immunosuppression - Heuristic model or clinical concern?

Girolamo A. Ortolano¹, Rosalind Russell¹, Anthony Capetandes¹, Barry Wenz²

¹ Scientific and Laboratory Services

² Medical Director, Pall Medical, Pall Corporation, New York, USA

Allogeneic blood transfusion is accompanied by immunomodulatory effects, notably immune suppression.

Clinical evidence suggests the immunosuppressive effects of transfusion may contribute to an increased incidence of tumor recurrence and infectious complications in surgical patients; however, the subject remains controversial.

Most of the immunomodulatory effects of transfusion demonstrable *in vitro* are mediated by white blood cells or soluble products derived from them. Leukocytederived factors include soluble Fasligand (sFasL), human leukocyte antigens of Class I and II (sHLA-I, -II) as well as pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- α).

Additionally, some components of the complement cascade can attenuate immune responsiveness. The levels of these constituents present in component blood products, and their immunosuppressive potential, appear to vary with the type of blood product, its preparation and storage conditions and the volume transfused.

These confounding influences, generally not reported in clinical studies, may explain the failure to achieve consensus regarding the clinical relevance of transfusion related immunosuppression and the reported benefit of leukocyte reduction.

Assessing an immunosuppressive potential of blood products serves as an attempt toward a more complete characterization, and awareness, of these

La trasfusione di sangue allogenico si accompagna a immunomodulazione, in particolare a immunosoppressione. Evidenze cliniche indicano che gli effetti immunosoppressori possono contribuire, in pazienti chirurgici, a una incidenza maggiore di ricadute neoplastiche e di complicazioni infettive.

L'argomento resta, tuttavia, controverso.

La maggior parte degli effetti immunomodulatori della trasfusione dimostrabili *in vitro* è mediata da leucociti o da prodotti solubili di derivazione leucocitaria. Fra i prodotti solubili sono compresi il ligando della proteina di superficie Fas (sFasL), gli antigeni HLA di classe I e II (sHLA-I ed sHLA-II), così come alcune citochine proinfiammatorie, quali il TNF- α (*Tumor necrosis factor*-alfa). Inoltre, alcune componenti della cascata complementare possono ridurre la risposta immune.

Il livello di queste sostanze presenti negli emocomponenti e il loro potenziale immunosoppressivo variano con il tipo di emocomponente, con le modalità della sua preparazione e conservazione e con la quantità trasfusa.

Queste differenti e perturbanti influenze, solitamente non riportate nelle pubblicazioni, possono spiegare perché non si è ancora raggiunto un universale consenso sulla rilevanza clinica della immunosoppressione associata alla trasfusione e sugli asseriti benefici ottenibili con la leucoriduzione. Stimare il potenziale immunosoppressivo degli emocomponenti può servire a una più approfondita caratterizzazione di questi prodotti e a una maggiore conoscenza sul loro possibile impatto clinico. Individuare il potenziale immunosoppressivo degli emocomponenti trasfusi può offrire una base per controllare tali variabili nei futuri studi clinici.

Dr. Girolamo A Ortolano
Scientific and Laboratory Services
Pall Corporation
2200 Northern Boulevard
East Hills, NY 11548 - USA

constituents and their potential clinical impact.

Characterization of the immunosuppressive potential of transfused blood products may provide a basis for physical control of these variables in future clinical studies.

Controversy over the transfusion effect

Clinical studies confirm the association between allogeneic blood transfusion and their immunomodulatory effects which enhance the rate of successful renal engraftment in patients receiving cadaveric kidney transplants¹⁻³; a phenomenon known as the "transfusion effect".

The observation remains germane as combined therapies of transfusion and immunosuppressive agents continue to be studied⁴. Transfusions have long been associated with an increased risk of post-operative infections⁵⁻¹¹.

Although a substantial body of literature suggests infectious complications increase in patients receiving multiple transfusions, the effect may occur following a single transfusion¹².

The transfusion effect is thought to be mediated by leukocytes¹³ and soluble products derived from them.

Leukocyte reduction of components has been reported to ameliorate this effect in colorectal surgery patients¹⁴⁻¹⁶. Similar observations are reported in cardiac surgery^{17,18} and extensive reviews on transfusion-related immune suppression (TRIM) abound¹⁹⁻²⁴.

The prevailing view is that transfusion and infection are at least temporally, and may be causally, related. Transfusion may also predispose patients to an increased risk of tumor recurrence following solid organ surgery²⁵⁻²⁷.

The beneficial effect of leukocyte reduction in tumor recurrence has been challenged by some investigators²⁸⁻³². The controversy surrounding the role of leukocytes in post-operative infectious complications and tumor recurrence in surgical patients is important. It is well recognized that infectious complications are life-threatening and costly to manage³³⁻³⁶. The resolution of the controversy would provide continued support for the current trend to provide leukocyte reduced blood products for all patients^{37,38}. One approach to resolve this controversy may reside in current advances in

Controversie su "effetto trasfusione"

Studi clinici confermano il legame fra trasfusione di sangue allogenico ed effetti immunomodulanti che determinano un aumento della percentuale di attecchimento di trapianti renali da cadavere¹⁻³, fenomeno noto come "effetto trasfusione". Questa osservazione clinica è confacente al fatto che la terapia combinata di farmaci immunosoppressori e di trasfusioni rimane oggetto di investigazione scientifica⁴.

Le trasfusioni sono state associate, da molto tempo, a un maggior rischio di infezioni postoperatorie⁵⁻¹¹. Benché autorevoli dati della letteratura sostengano che le complicanze infettive aumentano nei pazienti politrasfusi, l'effetto può verificarsi anche dopo una singola trasfusione¹².

Si ritiene che l'effetto trasfusione sia mediato dai leucociti¹³ e dai prodotti solubili che da loro derivano.

E, infatti, viene riportato che la leucoriduzione diminuisce gli effetti negativi nei pazienti chirurgici affetti da patologia coloretale¹⁴⁻¹⁶. Simili osservazioni sono state riportate anche in cardiocirurgia^{17,18} e sono numerose le rassegne sugli effetti immunosoppressivi della trasfusione¹⁹⁻²⁴.

Il punto di vista predominante è che trasfusione e infezione sono, almeno temporalmente, ma forse causalmente, correlate fra loro.

La trasfusione può anche predisporre a un maggior rischio di ricaduta neoplastica, dopo interventi chirurgici in organi solidi²⁵⁻²⁷. L'effetto benefico della leucoriduzione sulle ricadute neoplastiche è stato contestato da alcuni Autori²⁸⁻³².

La controversia relativa al ruolo dei leucociti nelle infezioni postoperatorie e nelle ricadute neoplastiche in pazienti chirurgici è importante.

È ben noto come le complicanze infettive possono essere fatali e la loro gestione costosa³³⁻³⁶. Risolvere la controversia potrebbe dare supporto all'odierna tendenza di trasfondere tutti i pazienti con emocomponenti leucodepleti^{37,38}.

Un approccio scientifico in grado di risolvere la controversia potrebbe derivare dai più recenti progressi in immunobiologia trasfusionale²².

Parecchie sono state le ipotesi avanzate per spiegare l'effetto trasfusione³⁹⁻⁴². Esse riguardano: apoptosi leucocitaria, anergia, soppressione delle attività delle cellule *natural killer* (cellule NK), polarizzazione delle cellule Th2 e delle relative

Figure 1 - Summary of proposed mechanisms for Transfusion Effect. A general overview of humoral (yellow) and cellular (blue) immunity and the proposed immunosuppressive effects of blood constituents (numbered boxes and red dashed lines) are shown. Dashed lines represent inhibition and solid lines activation. Soluble (C3a, sHLA-I, sHLA-II, sFasL, cytokines) and cellular constituents (live immunocompetent or apoptotic cells) in blood products may cause the transfusion effect through the following mechanisms: 1-apoptosis, 2-nergy, 3-NK cell suppression, 4-Th2 polarization, 5-microchimerism. sFasL can induce *apoptosis* (programmed cell death) of Fas-expressing cells including CTL, NK-cells, B-cells and Macrophage/Monocytes. sHLA-I can induce apoptosis (also through sFasL-related mechanisms). Immunosuppression can occur through the deletion of critical immune cells. *Anergy* (cell non-responsiveness) associated with soluble HLA-I and HLA-II. When sHLA-I and HLA-II bind their natural receptors on T cells (CD8 and CD4 respectively), receptor blockade occurs and this can cause immunosuppression by the inhibition of these cells to respond to antigen. (sometimes IL-2 can reverse this effect). *NK cell suppression* may be associated with complement fragment (C3a), or sFasL (deletional suppression). NK cell suppression or deletion may be immunosuppressive because these cells are critical in the innate immune response. *Th1/Th2 imbalance* associated with cellular or cytokine polarization as may occur through complement (C3a) suppression of IL-6 and TNF- α production, sHLA II blockade of Th0:M \emptyset interactions, apoptotic cell suppression of M \emptyset (decreased IL-1, IL-12, and TNF- α and increased IL-10 production) leads to reduced co-stimulation of T cells. Polarization of the immune response toward the Th2 phenotype promotes humoral immunity and inhibits cellular immunity (Th2) and is therefore immunosuppressive because both arms of the immune response are necessary for full function. *Microchimerism* (mixed cell population) associated with the persistence of viable donor cells (and associated antigen such as HLA-I) in transfused patients. Constant exposure to low doses of antigen causes tolerance (immunosuppression)

transfusion immunobiology²². Several hypotheses have been provided to explain the transfusion effect (reviewed in ³⁹⁻⁴²) including leukocyte apoptosis, anergy, natural killer cell (NK-cell) suppression, Th2

citochine, microchimerismo. Questi meccanismi vengono schematizzati in figura 1, mentre la pertinente legenda indica gli esempi di sostanze cellulari e solubili rinvenute negli emocomponenti e spiega come

cell and cytokine polarization, and microchimerism. These mechanisms are summarized in Figure 1 and examples of soluble and cellular constituents found in blood components and how they act within the framework of the hypotheses are explained in the legend.

Soluble mediators of the transfusion effect

Complement proteins are well-characterized mediators of the innate immune response^{43,44} as well as important contributors to adaptive or acquired immune mechanisms^{45,46}. Complement deficiency studies have revealed the importance of these proteins in maintaining the integrity of the immune system⁴⁷. Although they are not generally perceived as mediators of transfusion-associated immunosuppression, there are data showing complement activation fragments may suppress secondary antibody response^{48,49}, modulate pro-inflammatory cytokine levels⁵⁰⁻⁵² and diminish NK-cell activity⁵³.

The smaller activation fragment of the third component of complement, i.e., C3a, as well as its primary metabolite, C3a^{desArg77}, has been shown to elicit immunosuppressive effects *in vitro*. In one study⁴⁸, lymphocytes derived from animals previously immunized to nitrophenols showed a dose-dependent attenuation of antibody-mediated lysis of nitrophenol-conjugated sheep red blood cells *in vitro* with either C3a or its metabolite C3a^{desArg77}.

Another study reported that C3a receptor occupancy (C3a or C3a^{desArg77}) on stimulated B-cells results in attenuation of the release of humoral mediators of inflammation including immunoglobulins, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin (IL)-6⁵¹. Yet another study showed C3a, and its metabolite, effectively inhibit NK-cell activity in a dose-dependent manner using a classic *in vitro* model of Cr51 release from pre-loaded tumor cells that serve as a target for NK-cell activity⁵³. Concentrations required to achieve these effects were in the range of micrograms per mL. C3a is normally present in the circulation at concentrations approximating 0.2 micrograms per mL but can rise to levels approximating those seen to have immunosuppressive effects *in vitro*⁵⁴⁻⁵⁷.

Plasma-rich components contain progressively increasing levels of C3a with continued storage

essi possono agire secondo le ipotesi emesse al riguardo.

Mediatori solubili dell'effetto trasfusione

Le **proteine del complemento** sono mediatori, ben caratterizzati, della risposta immune congenita^{43,44} e danno un contributo importante ai meccanismi immunologici adattativi o acquisiti^{45,46}. Gli studi sulle deficienze di proteine complementari hanno sottolineato la loro importanza nel mantenere l'integrità del sistema immune⁴⁷. Benché esse non vengano generalmente ritenute diretti mediatori della immunosoppressione associata alla trasfusione, vi sono dati che dimostrano come i frammenti di attivazione del complemento possano sopprimere la risposta anticorpale secondaria^{48,49}, modulare il livello delle citochine proinfiammatorie⁵⁰⁻⁵² e diminuire l'attività delle cellule NK⁵³.

Il frammento più piccolo del terzo componente del complemento, cioè C3a, e il suo principale metabolita, C3a^{desArg77}, si sono dimostrati in grado di provocare effetti immunosoppressivi *in vitro*. I linfociti derivanti da animali previamente immunizzati contro i nitrofenoli hanno mostrato, in uno studio⁴⁸, una diminuzione dose-dipendente della lisi *in vitro* mediata da anticorpi di cellule ovine coniugate con nitrofenolo, in presenza sia di C3a che del suo metabolita C3a^{desArg77}. Un altro studio ha riferito che il blocco (l'occupazione) del recettore di C3a (da parte di C3a o di C3a^{desArg77}) su cellule B stimolate determina una diminuita liberazione di mediatori umorali dell'infiammazione, comprese immunoglobuline, TNF- α e interleuchina (IL)-6⁵¹. Ancora un altro studio⁵³, impiegando il classico modello *in vitro* della liberazione di ⁵¹Cr da cellule neoplastiche preventivamente marcate, ha provato che il C3a e il suo metabolita inibiscono attivamente, con modalità dose-dipendente, l'attività delle cellule NK. Le concentrazioni richieste per ottenere questo risultato erano comprese in una gamma di microgrammi per millilitro. Il C3a è normalmente presente, in circolo, in una concentrazione di circa 0,2 μ g/mL ma può salire sino a livelli che si avvicinano a quelli in grado di determinare un effetto immunosoppressivo *in vitro*⁵⁴⁻⁵⁷.

Gli emocomponenti ricchi di plasma contengono livelli di C3a che aumentano progressivamente con i tempi di conservazione⁵⁸⁻⁶¹. La concentrazione può

time⁵⁸⁻⁶¹. Concentrations can range from 10-40 times normal circulating levels. Single donor or apheresis platelets show some of the highest levels⁶²⁻⁶⁴. Packed Red Blood Cells (pRBCs) have less plasma than platelets and therefore contain less C3a. Random donor platelets contain less C3a than most apheresis preparations. The longer platelets are stored, the greater the C3a level. If C3a is a determinant of the immunosuppressive effect of transfusion, we would expect it to prevail when older apheresis platelets are transfused.

Single donor blood can be leukoreduced with some apheresis machines, but that would not be expected to alter the supra-physiologic levels of C3a. Random donor and some apheresis platelets may be leukoreduced with filters and not all filters have the same effect on complement. Some filters remove C3a while others increase C3a levels⁶⁵⁻⁶⁸. The immunosuppressive effect of transfusing C3a to patients as unintended products of the production of blood components has not been studied and warrants consideration.

Soluble Human Leukocyte Antigens (sHLA), free or associated with β_2 -microglobulin, are elevated in the sera of patients with high levels of cellular destruction such as occurs in autoimmune disease, viral infection, acute graft-versus-host disease (GvHD), and allograft rejection⁶⁹⁻⁷². Class I and II sHLA are also present in various blood components and levels are influenced by the type of blood product, leukocyte reduction status and storage conditions⁷³⁻⁷⁸. sHLA may be associated with the transfusion effect as illustrated in Figure 1. Studies show that sHLA-I and sHLA-II have immunosuppressive activity *in vitro*⁶⁹⁻⁷¹. The highest degree of immunomodulatory activity was found in component supernatants that contain high levels of leukocytes ($1-3 \times 10^9$ cells/unit) in random donor platelets and nonleukocyte reduced packed red blood cells (pRBCs) stored for 30 days⁷⁸.

In vitro studies indicate that **sHLA-I** may modulate immune function by binding to its natural ligand (CD8) and inhibiting cytotoxic T lymphocyte (CTL) function through receptor blockade⁷⁹. Blockade prevents the interaction between CTLs and their target cells (such as viral infected cells with enhanced expression of HLA-I on their surface). Activated CD8+ cells (CTLs and NK-cells) can bind sHLA-I and secrete sFasL resulting in apoptosis⁸⁰⁻⁸³. Furthermore, apoptosis is induced in

far aumentare da 10 a 40 volte il livello riscontrato normalmente in circolo. I concentrati piastrinici (CP) da singolo donatore o da aferesi mostrano alcuni dei livelli più alti⁶²⁻⁶⁴. I concentrati eritrocitari (CE) contengono meno plasma di quelli piastrinici e, conseguentemente, contengono meno C3a. I CP da donatori *random* ne contengono meno rispetto alla maggioranza di quelli da aferesi. Più a lungo vengono conservati i CP, maggiore è il loro livello di C3a. Se effettivamente C3a è determinante ai fini dell'effetto immunosoppressivo, dovremo aspettarci che tale effetto sia più rilevante quando trasfendiamo i CP da aferesi più vecchi.

I CP da singolo donatore possono essere leucoridotti utilizzando alcuni separatori cellulari, ma non ci si può aspettare che tale procedura possa modificare livelli eccessivi di C3a. Si possono leucoridurre, mediante filtrazione, CP da donatori *random* o da aferesi ma non tutti i filtri ottengono gli stessi risultati per quanto riguarda il complemento. Alcuni filtri rimuovono il C3a, mentre altri ne aumentano il livello⁶⁵⁻⁶⁸. Gli effetti immunosoppressivi sul paziente determinati da C3a, quale prodotto inatteso (e indesiderato) nella produzione di emocomponenti, non sono ancora stati studiati in profondità e meritano notevole considerazione.

Gli **antigeni HLA solubili** (sHLA), associati o meno alla β_2 -microglobulina, si ritrovano in elevate quantità nei sieri di pazienti che presentano un alto tasso di distruzione cellulare, come avviene nelle malattie autoimmuni, nelle infezioni virali, nella GvHD e nel rigetto di allotrapianti⁶⁹⁻⁷². Antigeni solubili di I e II classe sono presenti anche in molti emocomponenti e il loro livello è influenzato dal tipo di prodotto, dallo stato di leucodeplezione e dalle condizioni di conservazione⁷³⁻⁷⁸. Gli sHLA possono determinare l'effetto trasfusione, come viene illustrato nella figura 1. Studi dimostrano che sHLA-I ed sHLA-II svolgono un'attività immunosoppressiva *in vitro*⁶⁹⁻⁷¹. Il più alto grado di attività immunomodulante è stato riscontrato nel supernatante di emocomponenti con maggiore quantità di leucociti (da 1 a 3×10^9 /unità) in CP da donatori *random* e in CE non leucodepleti, conservati per 30 giorni⁷⁸.

Studi *in vitro* indicano che **sHLA-I** possono modulare la funzionalità immunitaria unendosi al loro naturale ligando (CD8) e inibendo la funzione dei linfociti T citotossici (CTL), attraverso un blocco dei recettori⁷⁹. Il blocco impedisce la interazione fra CTL e cellule bersaglio (quali cellule infettate da virus

phytohemagglutinin-activated CTLs by sHLA-I purified from the sera of healthy donors and this is inhibited by competing antibody to CD8 or Fas receptors, demonstrating that apoptosis is Fas-dependent⁸³. Also, sHLA-I induced apoptosis was observed with CD8+ NK-cells through a Fas-dependent mechanism⁸⁴.

A concentration of 2.5µg/mL of sHLA-I was shown to induce apoptosis in 50% of CD8+ cells⁸³. This approximates the concentration shown to be present in non-leukoreduced pRBCs stored for 30 days⁷⁷ and even 5-day old pRBCs contain sHLA-I levels 10-fold higher than found in serum⁷⁷ suggesting that sHLA-I may play a role in mediating the transfusion effect.

Soluble HLA-II may bind to its natural ligand (CD4+) on T-helper (Th) cells and induce non-responsiveness or anergy of Th cells through receptor blockade^{85,86} as depicted in Figure 1. In the absence of co-stimulatory signals^{85,86} derived through cell-cell interactions between Th and antigen presenting cells (APCs) that express HLA-II, Th cells become non-responsive to immune challenge. This non-responsiveness can sometimes be reversed by providing co-stimulation signals such as IL-2⁸⁷.

It is possible that sub-optimal stimulation of T-cell receptor (TcR) may occur through receptor blockade with sHLA. A characteristic of naïve CD4+ T-cells is that low levels of TcR stimulation can promote the production of small amounts of IL-4⁸⁸.

This cytokine is critical in determining the development of Th2 cells. When threshold IL-4 levels are attained, as may occur in the transfusion of high concentrations of soluble antigen, the immune response is polarized toward the Th2 phenotype⁸⁹. This scenario would favour the hypothesis that the transfusion effect is associated with Th2/Th1 cellular imbalance and Th2 cytokine polarization⁹⁰.

Additionally, sHLA-I and sHLA-II can be presented to CD4+ cells by "indirect presentation" through phagocytosis and HLA class II-restricted presentation by professional APCs, the result of which could be either activation or tolerance⁹¹.

Membrane bound FasL and Soluble FasL (*sFasL*) signaling pathways may play a significant role in the induction of immunologic tolerance⁹²⁻⁹⁴. T-cell apoptosis induced by Fas/FasL binding (either sFasL or FasL on the surface of apoptotic cells) serves to down-regulate the immune response to antigen⁹²⁻⁹⁴. The Fas/FasL signaling pathway may

con un'espressione aumentata degli antigeni HLA-I sulla loro superficie). Cellule CD8-positive (CD8⁺), quali le CTL e le NK, possono legare gli antigeni sHLA-I e secernere sFasL, determinando la loro stessa apoptosi⁸⁰⁻⁸³. Inoltre, apoptosi viene indotta da sHLA-I purificati, provenienti da sieri di donatori sani, in CTL attivate da fitoemoagglutinina, mentre viene inibita dagli anticorpi diretti contro i recettori di CD8 o di Fas, con ciò dimostrandosi che essa è Fas-dipendente⁸³. Ancora, apoptosi indotta da sHLA-I è stata osservata con cellule NK CD8⁺, attraverso un meccanismo Fas-dipendente⁸⁴.

Si è dimostrato che una concentrazione di 2,5µg/mL di sHLA-I induce apoptosi nel 50% delle cellule CD8-positive⁸³. Questa concentrazione è assai vicina a quella presente in CE non leucoridotti e conservati per 30 giorni⁷⁷ e anche CE conservati per 5 giorni contengono un livello di sHLA-I 10 volte maggiore di quello ritrovato nel siero (dei donatori)⁷⁷, con ciò suggerendo che gli antigeni HLA solubili di I classe possono giocare un ruolo preciso nel mediare l'effetto trasfusione.

Gli **antigeni solubili HLA-II** possono associarsi al loro naturale ligando (CD4) sulle cellule Th (*T-helper*) e indurre una mancata risposta o un'anergia delle stesse Th, attraverso il blocco dei recettori^{85,86}, come illustrato in figura 1. In assenza di segnali di co-stimolazione^{85,86}, derivati dalla interazione cellula-cellula fra Th e cellule presentanti l'antigene (APC) che esprimono gli antigeni HLA di II classe, le cellule Th divengono non reattive agli stimoli antigenici. Questa mancata reattività può talora essere invertita impiegando segnali co-stimolatori come IL-2⁸⁷.

È possibile che si determini una stimolazione sub-ottimale del recettore delle cellule T (TcR), mediante il blocco del recettore tramite gli sHLA. Una caratteristica delle cellule T CD4⁺ vergini (non ancora stimulate) è che una bassa stimolazione di TcR può promuovere la produzione di piccole quantità di IL-4⁸⁸. Questa citochina è critica nel determinare lo sviluppo delle cellule Th2. Quando si raggiungono livelli-soglia di IL-4, come può avvenire in seguito a trasfusioni di prodotti ad alta concentrazione di antigeni solubili, la risposta immune viene polarizzata contro il fenotipo Th2⁸⁹. Questo scenario sembrerebbe favorire l'ipotesi che l'effetto trasfusione sia associato a uno squilibrio del rapporto Th2/Th1 e con una polarizzazione delle citochine di derivazione Th2⁹⁰.

Per di più, sHLA-I ed sHLA-II possono essere

Figure 2 - Fas/FasL-dependent pathways of apoptosis. Green arrows represent activation, red arrows represent transfusion, black arrows represent pathways, ligand binding or cell activity. Dark yellow bar represents the cell membrane of immune cells expressing Fas and light yellow its cytoplasm. Transfusion-derived apoptotic neutrophils can: 1. undergo secondary necrosis causing the release of FasL into the blood resulting in soluble FasL (sFasL) or, 2. express FasL on the neutrophil membrane. This leads to sFasL or FasL binding to Fas receptors expressed by immune cells. Either pathway 1 or 2, or sFasL transfused from the donor bag directly (pathway 3) results in activation of caspase-8. The subsequent caspase cascade results in activation of DNAses that degrade DNA leading to apoptosis of immune cells. In a separate pathway, transfusion-derived TNF- α binding to its receptor TNF-R1 mediates caspase 8 activation. The TNF- α may be derived from transfused soluble TNF- α or mononuclear cells. Hence, transfusion-derived apoptotic neutrophils may cause immune cell apoptosis leading to immunosuppression; this can be mitigated by pre-storage leukoreduction

contribute to the transfusion effect⁹⁵ through similar mechanisms. FasL expressed on the surface of apoptotic neutrophils, or sFasL released from apoptotic cells undergoing secondary necrosis, can bind to Fas expressed on immune-competent cells (including neutrophils, monocytes, activated B-, T-cells and NK-cells) and induce apoptosis as shown in Figure 2⁹⁶⁻⁹⁸. The concentration of sFasL required to elicit 50% of the cells to undergo apoptosis is approximately 50ng/mL *in vitro*⁷⁷. A significant concentration of sFasL has been shown to be present in the supernatant of stored blood components^{73,77,78}.

presentati alle cellule CD4⁺, attraverso un meccanismo indiretto, tramite fagocitosi e conseguente presentazione MHC-ristretta da parte delle cellule professionalmente deputate a tale presentazione (APC): il risultato di ciò può essere o attivazione o tolleranza⁹¹.

Anche i segnali indotti dal *FasL solubile (sFasL) e dal FasL associato alla membrana* possono giocare un ruolo nell'induzione di una tolleranza immunologica⁹²⁻⁹⁴. L'apoptosi delle cellule T indotta dal legame Fas/FasL (sia sFasL che FasL sulla superficie delle cellule apoptotiche) serve a

Levels range from 468ng/mL following 5 days of storage up to 1.9µg/mL at 30 days of storage in non-leukoreduced pRBCs⁷⁷. The source of sFasL is predominantly apoptotic leukocytes, the majority of which are neutrophils⁹⁸.

In contrast, leukoreduced blood products prepared within 3 hours of collection show levels of sFasL of <1ng/mL following 30 days of storage.

There are no data for the levels of sFasL in blood products leukoreduced between 3 and 24 hours from the time of collection, a common practice in Europe and elsewhere in the world. A consequence of destroying immune cells understandably translates to compromised immune function.

This is evidenced by mixed lymphocyte reaction (MLR) that was inhibited by the supernatant (containing sFasL, sHLA-I) from both allogeneic and autologous pRBCs; an effect that was partially reversed by immuno-depletion of sFasL⁷⁷. Pre-storage leukocyte reduction within 3 hours of blood collection completely reversed the inhibitory effect on the MLR⁷⁴.

Cellular mediators of the transfusion effect

Immunocompetent mononuclear cells vary in blood products as a function of the type of blood product, storage and processing conditions as well as donor characteristics^{99,100}.

Blood products that contain live immunocompetent cells may play a role in the transfusion effect by inducing microchimerism^{39,101}. This phenomenon has been demonstrated in recipients of solid organ allografts¹⁰², as well as those patients receiving multiple transfusions¹⁰³.

The mechanism by which microchimerism induces immunosuppression may be related to the persistence of donor leukocytes in the recipient and the subsequent deletion or induction of anergy in the recipient of donor-reactive cells^{104,105}.

Microchimerism may be more relevant to long-term allograft survival than generalized immunosuppression, however, the short term effect of deleting or inducing anergy of donor immune cells could contribute to increased incidence of postoperative infection or tumor recurrence.

Apoptotic cells. Stored blood products have been shown to contain varying degrees of apoptotic cells^{76,98,106,107}.

regolamentare in senso inibitorio la risposta immune all'antigene⁹²⁻⁹⁴. Il segnale Fas/FasL può contribuire all'effetto trasfusione attraverso un meccanismo consimile⁹⁵. FasL espresso sulla superficie di neutrofili apoptotici o sFas rilasciato da cellule apoptotiche che sono andate incontro ad una necrosi secondaria, possono legarsi al Fas espresso su cellule immunocompetenti (ivi compresi neutrofili, monociti e cellule B, T o NK attivate) e indurre apoptosi, come illustrato in figura 2⁹⁶⁻⁹⁸. La concentrazione di sFasL richiesta per determinare apoptosi nel 50% delle cellule è pari, approssimativamente, a 50 ng/mL *in vitro*⁷⁷. Si è dimostrato che una concentrazione significativa di sFasL è presente nel supernatante di emocomponenti conservati^{73,77,78}. I livelli variano da 468 ng/mL dopo 5 giorni di conservazione sino a 1,9 µg/mL a 30 giorni di conservazione in CE non leucodepleti⁷⁷. I leucociti apoptotici, la maggioranza dei quali sono neutrofili, rappresentano la maggior sorgente di sFasL⁹⁸. Inversamente, emocomponenti leucoridotti entro 3 ore dalla raccolta mostrano livelli di sFasL inferiori a 1 ng/mL, dopo 30 giorni di conservazione. Non esistono dati relativi ai livelli di sFasL in emocomponenti leucoridotti fra 3 e 24 ore dalla raccolta, una pratica assai diffusa in Europa e anche in altre parti del mondo. La distruzione di cellule immunocompetenti compromette evidentemente la funzionalità immune. Ciò è reso evidente dalla reazione linfocitaria mista (MLR), che viene inibita dai supernatanti (che contengono sFasL e sHLA-I) provenienti da CE autologhi e allogeneici, effetto che viene parzialmente rovesciato dalla neutralizzazione immune di sFasL⁷⁷. La leucodeplezione *prestorage*, entro 3 ore dalla raccolta, abolisce totalmente l'effetto inibitorio sulla MLR⁷⁴.

Mediatori cellulari dell'effetto trasfusione

La presenza di *cellule mononucleate immunocompetenti* è variabile negli emocomponenti, in rapporto diretto con il tipo di prodotto, con le condizioni di conservazione e di lavorazione così come con le caratteristiche del donatore^{99,100}. Emocomponenti che contengono cellule immunocompetenti vitali possono giocare un ruolo importante nell'effetto trasfusione, inducendo microchimerismo^{39,101}. Tale fenomeno è stato dimostrato in riceventi trapianti di organi solidi¹⁰²,

The rate of apoptosis in stored pRBCs is most rapid in the first 7 days of storage^{76,98} but continues to increase through 14 days, after which most cells have either undergone apoptosis (70%) or have become anergic to *in vitro* stimulation⁷³.

In platelet concentrates, apoptosis is also progressive, and may reach levels in excess of 60% by day four of storage¹⁰⁷. Apoptotic cells have been shown to exert immunosuppressive effects on macrophages¹⁰⁸⁻¹¹⁰ characterized by the inhibition of cytokine (IL-1, IL-12, TNF- α) synthesis and an increased production of IL-10. The net result of this cytokine profile is inhibition of both Th1 and Th2 responses.

Reduced macrophage IL-12 production was associated with increased patient susceptibility to post-operative infection¹¹¹. *In vitro* studies showed macrophage phagocytosis of apoptotic cells reduced efficacy of clearance of *Trypanosoma cruzi* parasitic infection¹⁰⁹.

Macrophage phagocytosis of apoptotic cells has been shown to cause the release of sFasL and induce the apoptosis of bystander leukocytes¹¹⁰.

In animal studies, injection of apoptotic cells enhanced the bone marrow survival and engraftment in major histocompatibility complex (MHC) incompatible mice¹¹².

The presence of a high fraction of apoptotic cells in transfusion products, as occurs with non-leukoreduced stored pRBCs or platelet concentrate, would be expected to contribute to the transfusion effect to reduce macrophage function and host ability to clear foreign antigen through phagocytic mechanisms.

Leukocytes appear to be the component of fresh blood that confers the greatest degree of immunosuppressive effect.

Gianotti and co-workers¹³ infused leukocytes, red cells or platelet-rich plasma prepared from C3H/HeJ mice into Balb/c mice five days prior to inducing 20% burns with *Escherichia coli* gavage to induce sepsis. Viability of bacteria and mortality was greatest in the mice transfused with allogeneic leukocytes.

Apoptotic neutrophils from non-leukoreduced stored blood may directly mediate systemic inflammatory effects independent of an immunosuppression consequent to T cell apoptosis.

Apoptotic neutrophils expressing FasL may directly interact with parenchymal cells of the heart, lung and liver that express Fas¹¹³.

così come in politrasfusi¹⁰³. Il meccanismo attraverso il quale il microchimerismo induce immunosoppressione può essere legato alla persistenza di leucociti del donatore nel ricevente e alla conseguente delezione o induzione di anergia in chi riceve cellule reattive a partenza dal donatore^{104,105}. Il microchimerismo può essere molto più pertinente per la sopravvivenza a lungo termine del trapianto piuttosto che per l'immunosoppressione; tuttavia, gli effetti a breve termine sulla delezione o sull'induzione di anergia da parte delle cellule immunocompetenti del donatore potrebbero contribuire ad aumentare l'incidenza di infezioni o di ricadute neoplastiche nel periodo postoperatorio.

È stato dimostrato che gli emocomponenti contengono varie quantità di **cellule apoptotiche**^{76,98,106,107}. Il ritmo di apoptosi nei CE è maggiore nei primi 7 giorni di conservazione^{76,98} ma continua ad aumentare sino al 14° giorno, dopo di che la maggioranza (~70%) delle cellule o sono soggiacite all'apoptosi o sono divenute anergiche alla stimolazione *in vitro*⁷³. Anche nei CP l'apoptosi si instaura progressivamente e può raggiungere livelli che superano il 60% della popolazione cellulare dopo 4 giorni di conservazione¹⁰⁷. Si è provato che le cellule apoptotiche esercitano effetti immunosoppressivi sui macrofagi¹⁰⁸⁻¹¹⁰: questi effetti sono caratterizzati dalla inibizione della sintesi di alcune citochine (IL-1, IL-12, TNF- α) e da un aumento della produzione di IL-10. La risultante che consegue a questo profilo delle citochine è una inibizione delle risposte di Th1 e di Th2. La ridotta produzione di IL-12 da parte dei macrofagi è stata correlata a una aumentata suscettibilità dei pazienti alle infezioni postoperatorie¹¹¹. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la fagocitosi di cellule apoptotiche da parte dei macrofagi riduce l'eliminazione del parassita in corso di infezione da *Trypanosoma cruzi*¹⁰⁹, causa la liberazione di sFasL e induce apoptosi sui leucociti presenti¹¹⁰. In modelli animali, l'iniezione di cellule apoptotiche favorisce, in topi incompatibili per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), l'attecchimento e la sopravvivenza dei trapianti di midollo osseo¹¹². La presenza di un alto numero di cellule apoptotiche negli emocomponenti, come avviene per CE o CP non leucodepleti, potrebbe contribuire all'effetto trasfusione, riducendo la funzione dei macrofagi e la capacità, da parte del ricevente, di eliminare gli antigeni estranei attraverso la fagocitosi.

This could account for multiple organ failure that often attends high volume transfusions as in trauma^{114,115}. This may also explain the association of pRBC transfusions with an increased incidence of acute lung injury¹¹⁶ and the development of post-bypass pneumonia associated with the increased length of storage time of pRBCs¹¹⁷.

Predictive clinical effects with leukocyte reduction methods

Blood products and storage conditions affect immune status by leukocytes and leukocyte-derived soluble factors which act as mediators of transfusion-associated immunosuppression.

Table I summarizes the work of several Authors in a semi-quantitative manner to facilitate the analyses of the differences that exist between blood products based upon storage conditions, leukocyte reduction status and immune suppressive potential.

The immune suppressive potential was derived from the *in vitro* data showing suppression of the MLR, cytotoxicity assays and induction of apoptosis. What is evident is that there are considerable gaps in our knowledge of the levels of immunosuppressive substances present in the various blood products as a function of preparation and storage conditions.

As expected, stored blood products that have not been leukoreduced tend to have high concentrations of apoptotic cells, as well as sFasL, sHLA-I and sHLA-II derived from them and this is translated into an increase in the *in vitro* immunosuppressive potential defined by decreased responsiveness to MLR⁷⁶.

There is a steady increase in apoptotic cells as a function of storage and by 30 days as many as 70% of the cells have become apoptotic and nonresponsive in MLR⁷⁶.

Similar results have been demonstrated for stored platelet concentrates with 40-50% of the cells being apoptotic by 5 days storage¹⁰⁷. While *in vitro* assays of immunosuppression did not accompany these studies, the predicted outcome may be similar to the results observed with pRBCs.

The presence of high levels of apoptotic cells may be predictive of the degree of immunosuppression.

As with apoptosis, soluble constituents derived

I **leucociti** sembrano essere i componenti del sangue fresco che conferiscono il più alto grado di immunosoppressione. Gianotti e collaboratori¹³ hanno trasfuso in topi Balb/c leucociti, emazie e PRP (plasma ricco di piastrine) prelevati a topi C3H/HeJ cinque giorni di prima di indurre ustioni estese al 20% della superficie corporea e infondendo, con sondino gastrico, batteri (*Escherichia coli*) per determinare sepsi. La vitalità dei batteri e la mortalità si sono dimostrate maggiori nei topi trasfusi con leucociti allogenici.

Anche i **neutrofili apoptotici** presenti nel sangue conservato non leucodepleto possono mediare direttamente effetti infiammatori indipendentemente dalla immunosoppressione che segue l'apoptosi delle cellule T. Questi neutrofili, che esprimono FasL, possono interagire con le cellule parenchimali cardiache, polmonari ed epatiche che esprimono Fas¹¹³. Ciò potrebbe rendere conto delle insufficienze multiorgano che intervengono spesso in chi riceve trasfusioni massive, come nei traumatizzati^{114,115}, e potrebbe anche spiegare la correlazione fra trasfusioni di CE e aumentata incidenza di TRALI (*transfusion-related acute lung injury*) o lo sviluppo di polmoniti dopo bypass¹¹⁶, in diretto rapporto con il prolungarsi della conservazione di CE¹¹⁷.

Presumibili effetti clinici della leucoriduzione

Il tipo di emocomponente e le condizioni di conservazione influiscono sul sistema immune del ricevente attraverso i leucociti e i fattori solubili di origine leucocitaria, che agiscono come mediatori dell'immunosoppressione correlata alla trasfusione.

La tabella I sintetizza i lavori di numerosi ricercatori con modalità semi-quantitativa per facilitare l'analisi delle differenze che esistono fra emocomponenti, in base alle condizioni di conservazione, allo stato di leucodeplezione e al potenziale di immunosoppressione.

Questo potenziale è stato tratto dai dati *in vitro* che hanno provato l'inibizione della MLR, dei test di citotossicità e l'induzione di apoptosi. È evidente che vi sono notevoli lacune nelle nostre conoscenze circa il tasso di sostanze immunosoppressive presenti nei diversi emocomponenti, in funzione delle differenti condizioni di preparazione e di conservazione.

Come atteso, gli emocomponenti conservati e non leucodepleti tendono ad avere una maggior

Table I - Immunosuppressive characteristics of component blood products used for transfusion. Abbreviations: BC = buffy coat; E = exponent (scientific notation representing 10 raised to the power of the number to the right); EC50 = effective concentration eliciting 50% of maximal immunosuppressive response; FFP = fresh frozen plasma; LR = leukoreduced; IC50 = concentration eliciting 50% inhibition of immune response; PC = platelet concentrate; pRBCs = packed red blood cells; RD = random donor; SD = single donor (apheresis); * = synthetic HLA peptide in MLR assay

Cellular constituents						
Blood products	WBC Content (cell/ μ L)	% Apoptotic Cell	<i>In vitro</i> Immunosuppressive Potential			
			% MLR (-IL-2)	% MLR (+IL-2)	% T-cell Prolif.	
<i>References</i>	<i>100,101</i>	<i>73,98,107</i>	<i>73</i>	<i>73</i>	<i>73</i>	
Whole blood	(1-5) E9					
Normal serum						
pRBCs (<2 hrs)	(0.5-3) E9	10-25%				
pRBCa (3-5 d)		35%	40-70	50-90		
pRBCs (7-10 d)	<1 E9	50%	20-25	50-75	50-60	
pRBCs (14 d)		50%	0	50-60	5-10	
pRBCs (20-21 d)		60%	0	20-30	0	
pRBCs (30 d)	<1 E9	70%	0	0	0	
pRBCs (34-42 d)	<1 E9					
Buffy Coat (BC) pRBCs	1.2 E9					
pRBCs (washed)	(0.001-1) E8					
pRBCs (deglycerolized)	(0.05-1) E8					
LR-pRBCs (30 d)	<5 E6					
LR-pRBCs (35-42 d)						
RD-PC (4-5 d)	(0.05-1) E8	40%				
BC-PC (24 hrs)						
BC-PC (4-5 d)						
BC-PC irradiated (4 d)		40%				
SD-PC (4-5 d)	(0.5-1) E9	50%				
LR-RD-PC (5 d)	<1 E6					
LR-SD-PC	<1 E6					
FFP	<1 E8					
LR-FFP	<1 E6					
EC50 or IC50		N/A				

Soluble constituents							
Blood products				<i>In vitro</i> Immunosuppressive Potential			
	sHLA-I (μ g/mL)	sHLA-II (μ g/mL)	C3a (μ g/mL)	TNF- α (pg/mL)	sFasL (ng/mL)	% Apoptosis (CD8* cell)	% CTL Activity
<i>References</i>	<i>74,77,78</i>	<i>77</i>	<i>64,122</i>	<i>119-121</i>	<i>77,78</i>	<i>78,94</i>	<i>74,78</i>
Whole blood							
Normal serum	1.7-2.7	0.15-0.5	200	0	<0.2	2-50	
pRBCs (<2 hrs)							
pRBCa (3-5 d)	1.06	2.5			468	11	75
pRBCs (7-10 d)	1.2	2.4			533	100	
pRBCs (14 d)							
pRBCs (20-21 d)	2.6	2.55			1.455	40	
pRBCs (30 d)	3.16-5	2.36-3.66			1.235-2.359	75-90	50
pRBCs (34-42 d)				2.4-151			
Buffy Coat (BC) pRBCs							
pRBCs (washed)	<1	<1			<1	12	75
pRBCs (deglycerolized)							
LR-pRBCs (30 d)	0.78-1.35	0.1-1.1			0.28-0.99	2	75
LR-pRBCs (35-42 d)							
RD-PC (4-5 d)	4-7	1-1.5	2.000	75-1.890	18-28	31	15
BC-PC (24 hrs)							
BC-PC (4-5 d)				14-125			
BC-PC irradiated (4 d)							
SD-PC (4-5 d)			500-16.000	82			
LR-RD-PC (5 d)							
LR-SD-PC							
FFP	0.58-2.77	0.06-0.3			<0.87	10	75
LR-FFP							
EC50 or IC50	2.5 ^{(77)*}	10 ⁽¹²⁴⁾	1.000 ^(48,53)	3.000 ⁽¹²³⁾	50 ⁽⁷⁷⁾		

from leukocytes and complement activation fragments, steadily increase as a function of storage time and leukocyte degradation within blood products⁷⁷.

In the instances where *in vitro* assays were performed to predict the immune suppressive effect of these soluble constituents, a correlation was seen as shown in Table I.

Nonleukocyte reduced older blood products have more soluble constituents and immunosuppressive potential than their leukocyte reduced counterparts.

How well the *in vitro* immune suppressive potential translates to clinical outcome is largely speculative at this juncture.

The differences in data for the same blood products that have been stored for 5 days versus 30 days could introduce considerable variability between patients if the immunosuppressive potential did translate to clinical sequelae.

From Table I it is clear that a fresh pRBCs which contains less than 15% apoptotic cells would not be equivalent to a 30-day old pRBC unit if infusion of apoptotic cells correlates with immunosuppression.

Similarly, a fresh platelet product that may contain 10-15% apoptotic cells¹⁰⁷ and a 5-day old platelet product would not present equivalent exposure to apoptotic cells or soluble constituents such as cytokines.

Support for the view that aged blood products put patients at risk for postoperative infections has recently been acquired in a clinical study examining this question directly¹¹⁸.

Conclusions

The conflicting clinical data regarding the benefit of leukocyte reduction in attenuating post-operative infectious complications and cancer recurrence could be explained in part by the variability of the transfusion products.

This review summarizes the soluble and cellular constituents in blood products that could contribute to the "transfusion effect".

Prospective studies of the immunosuppressive effects of transfusion should consider the influence of the blood products transfused as they relate to the levels of apoptotic cells, C3a, and its nonanaphylatoxic but immunosuppressive metabolite, C3a^{desArg77} as well as sHLA-I, sHLA-II and sFasL.

concentrazione di cellule apoptotiche, così come di FasL, di sHLA-I e di sHLA-II, che da esse derivano. Ciò si traduce in un'aumentata potenzialità di immunosoppressione *in vitro*, come dimostrato dalla ridotta risposta in coltura linfocitaria mista⁷⁶. Vi è un continuo aumento di cellule apoptotiche in rapporto alla conservazione e, dopo 30 giorni, più del 70% di cellule sono divenute apoptotiche e non reattive in MLR⁷⁶. Risultati consimili si dimostrano anche per i CP con il 40-50% di cellule divenute apoptotiche dopo 5 giorni di conservazione¹⁰⁷. Anche se test di immunosoppressione *in vitro* non accompagnano questi studi, i risultati potrebbero essere simili a quelli osservati con i CE. La presenza di un alto tasso di cellule apoptotiche può essere predittivo del grado di immunosoppressione.

Come per le cellule apoptotiche, anche le sostanze solubili derivate dai leucociti e i fattori di attivazione del complemento aumentano in diretto rapporto con la durata della conservazione e la degradazione dei leucociti negli emocomponenti⁷⁷. Nei casi nei quali sono stati effettuati test *in vitro* per predire l'effetto immunosoppressivo di queste sostanze solubili, è stata dimostrata una correlazione, come illustrato in tabella I.

Gli emocomponenti più vecchi e non leucoridotti hanno più sostanze solubili e un maggior potenziale immunosoppressivo, rispetto ai prodotti analoghi ma leucodepleti.

Al momento, trasferire il potenziale immunosoppressivo dimostrato *in vitro* a risultati clinici (*in vivo*) è altamente speculativo. Le differenze fra i dati riscontrati sugli stessi emocomponenti conservati per 5 o per 30 giorni potrebbe introdurre considerevoli variabilità fra i pazienti se il potenziale immunosoppressivo fosse trasferito a sequele cliniche. Dalla tabella I risulta evidente che un CE fresco contenente circa un 15% di cellule apoptotiche non può essere equivalente a un CE vecchio di 30 giorni, semprché l'infusione di cellule apoptotiche correli (realmente) con l'immunosoppressione. Egualmente, un CP fresco che contenga un 10-15% di cellule apoptotiche e un CP di 5 giorni non determineranno una equivalente esposizione a cellule apoptotiche o a costituenti solubili come le citochine.

Una prova che gli emocomponenti più vecchi pongono i pazienti a un maggior rischio di infezioni postoperatorie è stato recentemente acquisita da uno studio clinico che ha preso in considerazione direttamente questo problema¹¹⁸.

Doing so may uncover the clinical relevance of the transfusion effect in surgical patients.

This review also supports the potential of leukocyte reduction to abrogate the transfusion effect.

Prestorage reduction of neutrophils by filtration would reduce the pool of donor cells that contributes to the sFasL-mediated apoptosis of recipient T-cells.

Prestorage leukocyte reduction alone may not mitigate all immunosuppressive characteristics in a blood product because complement levels in plasma rich component blood products may be elevated at the time of transfusion.

Although some filters reduce C3a and its immunosuppressive metabolite, and could possibly influence the immunosuppressive effect by use at the bedside at the time of transfusion, others increase them.

Moreover, some methods of preparation of platelets, notably apheresis machines, may dramatically increase C3a as well.

One implication of the studies reviewed here relate to the notion that WBC inactivation (as may occur with gamma-irradiation, and certain methods of pathogen inactivation or reduction) may obviate the need for leukocyte reduction.

An increased concentration of apoptotic cells was shown in single donor platelet products that were irradiated¹⁰⁷.

If immunosuppression is mediated in part by apoptotic cells or soluble constituents derived from the degradation of apoptotic leukocytes, then WBC inactivation methods may not mitigate the transfusion effect, since apoptotic leukocytes bearing FasL and degradation products including soluble forms of FasL, sHLA-I and sHLA-II will likely remain in the transfused product.

Even if the blood product is washed, washing alone does not substantially remove or reduce cells.

Refinement of the clinical studies may show that the frequency of the "transfusion effect" may be actually much greater than is reported.

This proposed under-reporting of the transfusion effect may be due to the lack of consideration of the type of blood products transfused, the manner of preparation, and the storage conditions.

It is suggested that if greater attention is afforded the qualitative differences in the blood products used and these variables are controlled for either

Conclusions

I discordanti dati clinici relativi ai benefici effetti della leucodeplezione nel ridurre le complicazioni infettive e le ricadute neoplastiche nel periodo postoperatorio potrebbero essere spiegate, almeno in parte, dalla variabilità degli emocomponenti. Questa Rassegna prende in esame, sinteticamente, le sostanze solubili e cellulari che possono contribuire all'effetto trasfusione. Studi prospettici sugli effetti immunosoppressivi della trasfusione dovrebbero considerare l'influenza degli emocomponenti trasfusi in rapporto al loro contenuto in cellule apoptotiche, in C3a^{desArg77}, in sHLA-I, in sHLA-II e in sFasL. Ciò facendo, si può scoprire l'importanza clinica dell'effetto trasfusione sui pazienti chirurgici. La rassegna avalla anche la potenzialità della leucodeplezione nell'abrogare l'effetto trasfusione. La riduzione *prestorage* dei neutrofili, mediante filtrazione, dovrebbe ridurre il pool delle cellule del donatore che contribuiscono all'apoptosi delle cellule T del ricevente mediata da sFasL. La leucoriduzione *prestorage* da sola non può ridurre totalmente tutta l'attività immunosoppressiva di un prodotto trasfusionale, dato che il tasso di componenti complementari in emocomponenti ricchi di plasma può essere elevato al momento della trasfusione. Nonostante che alcuni filtri siano in grado di ridurre il C3a e i suoi metaboliti ad azione immunosoppressiva, e di influire, quindi, su tale azione con il loro uso al momento della trasfusione (filtrazione *bedside*), altri la aumentano. Inoltre, alcune metodiche di preparazione di CP, in particolare quelle da aferesi, possono aumentare consistentemente la presenza di C3a. Un'implicazione degli studi analizzati in questa rassegna riguarda la nozione che l'inattivazione dei globuli bianchi (che si può ottenere con raggi gamma o con certi metodi di inattivazione o riduzione dei patogeni) può rendere superflua la leucodeplezione. Un'aumentata concentrazione di cellule apoptotiche è stata dimostrata in CP da singolo donatore sottoposti a irradiazione¹⁰⁸. Se l'immunosoppressione è mediata, almeno in parte, da cellule apoptotiche o dai prodotti solubili che da esse derivano, allora l'inattivazione dei globuli bianchi non è in grado di ridurre l'effetto trasfusione, dato che i leucociti apoptotici portano FasL e che i prodotti della loro disgregazione, comprendenti le forme solubili di FasL, di sHLA-I e di sHLA-II, rimarrebbero, con ogni probabilità

statistically or physically, there may be a more dramatic "transfusion effect" to be uncovered in clinical trials.

Acknowledgments

This review has been reproduced, with the permission of the Authors and of the Journal *from Modern Aspects of Immunobiology* 2002; **2**: 159-63.

The collaboration of the firm Pall Italia is gratefully acknowledged.

nell'emocomponente. Anche se l'emocomponente fosse sottoposto a lavaggio, le cellule non sarebbero rimosse né ridotte di numero.

Studi clinici più raffinati potrebbero provare che la frequenza dell'effetto trasfusione è, in realtà maggiore rispetto a quanto viene denunciato. Queste presumibili mancate segnalazioni potrebbero essere dovute al fatto di non considerare il tipo di emocomponente trasfuso, i metodi della sua preparazione e le condizioni di conservazione.

Si ritiene che se venisse posta una maggiore attenzione alle differenze qualitative esistenti fra gli emocomponenti trasfusi e se tali variabili fossero controllate dal punto di vista statistico e medico, si riscontrerebbe negli studi clinici un effetto trasfusione molto più frequente.

Ringraziamenti

Questa rassegna è stata riprodotta, previa autorizzazione degli Autori e della Rivista, da *Modern Aspects of Immunobiology* 2002; **2**: 159-63.

Si ringrazia la Pall Italia per la fattiva collaborazione nel raccordo con gli Autori.

References

- 1) Opelz G, Sengar DPS, Mickey MR, Terasaki PI. Effect of blood transfusion on subsequent kidney transplant. *Transplant Proc* 1973; **5**: 253-9.
- 2) Opelz G, Terasaki PI. Prolongation effect of blood transfusion on kidney survival. *Transplantation* 1976; **22**: 380-3.
- 3) Opelz G, Terasaki PI. Improvement of kidney-graft survival with increased numbers of blood transfusions. *N Engl J Med* 1978; **299**: 799-803.
- 4) Opelz G, Vanrenterghem Y, Kriste G, et al. Prospective evaluation of pretransplant blood transfusion in cadaver kidney recipients. *Transplantation* 1997; **63**: 964-7.
- 5) Chelemer SB, Prato BS, Cox PM Jr, et al. Association of bacterial infection and red blood cell transfusion after coronary artery bypass. *Ann Thorac Surg* 2002; **73**: 138-42.
- 6) Wang FD, Chang CH. Risk factors of deep sternal wound infections in coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiovasc Surg* 2000; **41**: 709-13.
- 7) Chang H, Hall GA, Geerts WH, et al. Allogeneic red blood cell transfusion is an independent risk factor to the development of postoperative bacterial infection. *Vox Sang* 2000; **78**: 13-8.
- 8) Michalopoulos A, Stavridis G, Geroulanos S. Severe sepsis in cardiac surgical patients. *Eur J Surg* 1998; **164**: 217-22.
- 9) Houbiers JG, van de Vedde CJ, van de Watering LM, et al. Transfusion of red cells is associated with increased incidence of bacterial infection after colorectal surgery: a prospective study. *Transfusion* 1997; **37**: 126-34.
- 10) Graves TA, Cioffi WG, Mason AD Jr, et al. Relationship of transfusion and infection in a burn population. *J Trauma* 1989; **29**: 948-52.
- 11) Edna TH, Bjerkeset T. Association between blood transfusion and infection in injured patients. *J Trauma* 1992; **33**: 659-61.
- 12) Vignali A, Braga M, Gianotti L, et al. A single unit of transfused allogeneic blood increases postoperative infections. *Vox Sang* 1996; **71**: 170-5.
- 13) Gianotti L, Pyles T, Alexander JW, et al. Identification of the blood component responsible for increased susceptibility to gut-derived infection. *Transfusion* 1993; **33**: 458-65.

- 14) Jensen LS, Kissmeyer-Nielsen P, Wolff B, Qvist N: Randomized comparison of leucocyte-depleted versus buffy-coat-poor blood transfusion and complications after colorectal surgery. *Lancet* 1996; **348**: 841-5.
- 15) Jensen LS, Hokland M, Nielsen HJ. A randomized controlled study of the effect of bedside leucocyte depletion on the immunosuppressive effect of whole blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *Br J Surg* 1996; **83**: 973-7.
- 16) Jensen LS, Grunnett N, Hanberg-Sorensen F, Jorgensen J. Cost-effectiveness of blood transfusion and white cell reduction in elective colorectal surgery. *Transfusion* 1995; **35**: 719-22.
- 17) van den Watering LM, Hermans J, Houbiers JG, et al. Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery. A randomized clinical trial. *Circulation* 1998; **97**: 562-8.
- 18) Connery C, Rahman, Abebe L, et al. White cell filtration of transfused blood and/or blood products reduces infections in cardiopulmonary bypass patients undergoing revascularization. *Chest* 2000, **118** (Suppl), 143S-4S.
- 19) Blumberg N, Heal JM. Blood transfusion immunomodulation: the silent epidemic. *Arch Pathol Lab Med* 1998, **122**: 117-9.
- 20) Spiess BD. Blood transfusion: the silent epidemic [review]. *Ann Thorac Surg* 2001; **72**: S1832-7.
- 21) Claas FH, Roelen DL, van Rood JJ, Brand A. Modulation of alloimmune response by blood transfusions. *Transf Clin Biol* 2001; **8**: 315-7.
- 22) Blajchman MA, Dzik S, Vamvakas EC, et al. Clinical and molecular basis of the transfusion-induced immunomodulation: summary of the proceedings of a state-of-art conference [review]. *Transfus Med Rev* 2001; **15**: 108-35.
- 23) Lee JH, Klein HG. From leukocyte reduction to leukocyte transfusion: the immunological effects of transfused leukocytes. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000; **13**, 585-600.
- 24) Roelen DL, van Rood JJ, Brand A, Claas FJH. Immunomodulation by blood transfusion. *Vox Sang* 2000, **78** (Suppl 2): 273-5.
- 25) Heiss MM, Mempel W, Delanoff C, et al. Blood transfusion-modulated tumor recurrence: first results of a randomized study of autologous versus allogeneic blood transfusion in colorectal cancer surgery. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 1859-67.
- 26) Woolley AL, Hogikyan ND, Gates GA, et al. Effect of blood transfusion on recurrence of head and neck carcinoma. Retrospective review and meta-analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992; **101**: 724-30.
- 27) Liewald F, Wirsching RP, Zulke C, et al. Influence of blood transfusion on tumor recurrence and survival rate in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1990; **26**: 327-35.
- 28) Bush OR, Hop WC, Marquet RL, Jeekel J. Blood transfusions and local tumor recurrence in colorectal cancer. Evidence of a noncausal relationship. *Ann Surg.* 1994; **220**: 791-7.
- 29) Steup WH, Hojo K, Moriya Y, et al. An analysis on the effect of blood transfusion on recurrence and survival in patients undergoing extended lymphadenoidectomy for colorectal cancer [review]. *Hepatogastroenterology* 1994; **41**: 253-9.
- 30) Swisher SG, Holmes EC, Hunt KK, et al. Perioperative blood transfusion and decreased long-term survival in esophageal cancer. *Thorac Cardiovascular Surg* 1996; **112**: 341-8.
- 31) Celikkanat S, Koc C, Akyol MU, Ozdem C. Effect of blood transfusion on tumor recurrence and postoperative pharyngocutaneous fistula formation in patients subjected to total laryngectomy. *Acta Otolaryngol* 1995; **115**: 566-8.
- 32) Donohue JH, Williams S, Cha S, et al. Perioperative blood transfusions do not affect disease recurrence of patients undergoing curative resection of colonrectal carcinoma: a Mayo/North Central Cancer Treatment Group study. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 1671-8.
- 33) Ghali WA, Hall RE, Ash AS, Moskowitz MA. Identifying pre- and postoperative predictors of cost and length of stay for coronary artery bypass surgery. *Am J Med Qual* 1999; **14**: 248-54.
- 34) Jenney AW, Harrington GA, Russo PL, Spelman DW. Cost of surgical site infections following coronary artery bypass surgery. *ANZ J Surg* 2001; **71**: 662-4.
- 35) Hollebeak CS, Murphy DM, Koenig S, et al. The clinical and economic impact of deep chest surgical site infection following coronary artery bypass graft surgery. *Chest* 2000; **118**: 397-402.
- 36) Digiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; **160**: 976-81.
- 37) Vamvakas E, Blajchman MA. Universal WBC reduction: the case for and against [review]. *Transfusion* 2001, **41**: 691-712.
- 38) Sherman LA: Universal leukoreduction: state of the art and the nature of decision making. *Arch Pathol Lab Med* 2002; **126**: 220-2.
- 39) Vamvakas EC, Blajchman MA, editors. *Immunomodulatory Effects of Blood Transfusion*. Bethesda MD; AABB Press; 1999.
- 40) Kirkley SA. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; **6**: 652-7.
- 41) Vamvakas EC, Blajchman MA. Deleterious clinical effects of transfusion-associated immunomodulation: fact or fiction? *Blood* 2001; **97**: 1180-95.

- 42) Pereira A. Deleterious consequences of allogeneic blood transfusion on postoperative infection: really a transfusion-related immunomodulation effect? *Blood* 2001; **98**: 498-500.
- 43) Walport MJ. Complement. First of two parts [review]. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1058-66.
- 44) Walport MJ. Complement. Second of two parts [review]. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1140-4.
- 45) Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of the complement in inflammation and adaptive immunity [review]. *Immunol Rev* 2001; **180**: 5-15.
- 46) Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity [review]. *Immunol Rev* 2001; **180**: 35-48.
- 47) Linton S. Animal models of inherited complement deficiency. *Mol Biotechnol* 2001; **135**: 135-48.
- 48) Hobbs MV, Feldbush TL, Needleman BW, Weiler JM. Inhibition of secondary *in vitro* antibody responses by the third component of complement. *J Immunol* 1982; **128**: 1470-5.
- 49) Weiler JM, Hobbs MV. Role of the third component of complement in immunoregulation [review]. *Concepts Immunopathol* 1987; **4**: 103-28.
- 50) Morgan EL, Weigle WO, Erickson BW, et al. Suppression of humoral immune responses by synthetic C3a peptides. *J Immunol* 1983; **131**: 2258-61.
- 51) Fisher WH, Hugli TE. Regulation of B cell functions by C3a and C3a^{desArg}: suppression of TNF- α , IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol* 1997; **159**: 4279-86.
- 52) Fisher WH, Jagels MA, Hugli TE. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a^{desArg}. *J Immunol* 1999; **162**: 453-9.
- 53) Charriat C, Senik A, Kolb JP, et al. Inhibition of *in vitro* natural killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 6003-7.
- 54) Harada T, Sakagami M, Sano M, Matsunaga T. Measurement of anaphylatoxin activity during surgery. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993; **501**: 88-91.
- 55) Solomkin JS, Cotta La, Satoh PS, et al. Complement activation and clearance in acute illness and injury: evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man. *Surgery* 1985; **97**: 668-78.
- 56) Moat NE, Shore DF, Evans TW. Organ dysfunction and cardiopulmonary bypass: the role of complement and complement regulatory proteins [review]. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; **7**: 563-73.
- 57) Pfeifer PH, Breme JJ, Brunson M, Hugli TE. Plasma C3a and C4a levels in liver transplant recipients: a longitudinal study. *Immunopharmacol* 2000; **46**: 163-74.
- 58) Schleuning M, Bock M, Mempel W. Complement activation during storage of single-donor platelet concentrates. *Vox Sang* 1994; **67**: 144-8.
- 59) Miletic VD, Popovic O. Complement activation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1993; **33**: 150-4.
- 60) Schleuning M, Hutz M, Mempel W. Effects of leukocyte depletion on the formation of anaphylatoxins in stored whole blood. *Infusionther Transfusionmed* 1992; **19**: 242-4.
- 61) Schleuning M, Schmid-Halsbeck M, Utz H, et al. Complement activation during storage of blood under normal blood bank conditions. Effects of proteinase inhibitors and leukocyte depletion. *Blood* 1992; **79**: 3071-5.
- 62) Schooneman F, Claise C. The storage quality of apheresis platelets-analysis of results from seven different cell separators. *Transfus Sci* 1996; **17**: 559-74.
- 63) Glase A, Friedlein H, Zingsem J, et al. Storage of single donor platelet concentrates: paired comparison of storage as single or double concentrates. *J Clin Apheresis* 2001; **16**: 148-54.
- 64) Shimizu T, Uchigiri C, Mizuno S, et al. Adsorption of anaphylatoxins and platelet-specific proteins by filtration of platelet concentrates with a polyester leukocyte reduction filter. *Vox Sang* 1994; **66**: 161-5.
- 65) Geiger TL, Perrotta PL, Davenport R, et al. Removal of anaphylatoxins C3a and C5a and chemokines interleukin 8 and RANTES by polyester white cell-reduction and plasma filter. *Transfusion* 1997; **37**: 1156-62.
- 66) Snyder EL, Mechanic S, Baril L, Davenport R. Removal of soluble biologic response modifiers (complement and chemokines) by a bedside white cell-reduction filter. *Transfusion* 1996; **36**: 707-13.
- 67) Ferrer F, Rivera J, Corral J, et al. Evaluation of leukocyte-depleted platelet concentrates obtained by in-line filtration. *Vox Sang* 2000; **78**: 235-41.
- 68) Ferrer F, Rivera J, Corral J, et al. Evaluation of pooled platelet concentrates using prestorage versus poststorage WBC-reduction: impact of filtration timing. *Transfusion* 2000; **40**: 781-8.

- 69) van Rood J, van Leeuwen A, van Santen MC. Anti-HL-A2 inhibitor in normal human serum. *Nature* 1970; **226**: 366-7.
- 70) Allison JP, Pellegrino MA, Ferrone S, et al. Biologic and chemical characterization of HLA antigens in human serum. *J Immunol* 1977; **118**: 1004-9.
- 71) Charlton RK, Zmijewski CM. Soluble HL-A7 antigen: localization in the beta-lipoprotein fraction of human serum. *Science* 1970; **170**: 636-7.
- 72) Puppo F, Scudeletti M, Indiveri F, Ferrone S. Serum HLA class I antigens: markers and modulators of an immune response? *Immunol Today* 1995; **16**: 124-7.
- 73) Mincheff M, Loukinov D, Zoubak S, et al. Fas and Fas ligand expression on human peripheral blood leukocytes. *Vox Sang* 1998; **74**:113-21.
- 74) Ghio M, Contini P, Mazzei C, et al. Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusion. *Blood* 1999; **93**: 1770-7.
- 75) Dzik S, Szufflad P, Eaves S: HLA antigens on leukocyte fragments and plasma proteins: prestorage leukoreduction by filtration. *Vox Sang* 1994; **66**: 104-11.
- 76) Mincheff MS. Changes in donor leukocytes during blood storage. Implications for post-transfusion immunomodulation and transfusion-associated GVHD. *Vox Sang* 1998; **74** (Suppl 2): 189-200.
- 77) Ghio M, Contini P, Mazzei C, et al. In vitro immunosuppressive activity of soluble HLA class I and Fas ligand molecules: do they play a role in autologous transfusion? *Transfusion* 2001; **41**: 988-96.
- 78) Ghio M, Contini P, Mazzei C, et al. Soluble HLA class I and Fas ligand molecules in blood components and their role in the immunomodulatory effects of blood transfusions. *Leukemia and Lymphoma* 2000, **39**: 29-36.
- 79) Hausmann R, Zavazava N, Steinmann J, Müller-Ruchholtz W. Interaction of papain-digested HLA class I molecules with human alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTC). *Clin Exp Immunol* 1993; **91**: 183-8.
- 80) Contini P, Ghio M, Merlo A, et al. Soluble HLA class I/CD8 ligation triggers apoptosis in EBV-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by Fas/Fas-ligand interaction. *Hum Immunol* 2000; **61**:1347-51.
- 81) Zavazava N, Kronke M. Soluble HLA class I molecules induce apoptosis in alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nat Med* 1996;**2**:1005-10.
- 82) Fournel S, Aguirre-Girr M, Huc X, et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8⁺ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 2000 **15**; **164**:6100-4.
- 83) Puppo F, Contini P, Ghio M, et al. Soluble human MHC class I molecules induce soluble Fas ligand secretion and trigger apoptosis in activated CD8⁺ Fas (CD95)⁺ T lymphocytes. *Int Immunol* 2000;**12**:195-203.
- 84) Spaggiari GM, Contini P, Carosio R, et al. Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. *Blood* 2002; **99**: 1706-14.
- 85) Jenkins MK. The role of cell division in the induction of clonal anergy [review]. *Immunol Today* 1992;**13**: 69-73.
- 86) Bretscher P. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later [review]. *Immunol Today* 1992;**13**:74-6.
- 87) Essery G, Feldmann M, Lamb JR. Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* 1988; **64**: 413-7.
- 88) Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2) [review]. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; **85**: 9-18.
- 89) Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines [review]. *Cell* 1994;**76**: 241-51.
- 90) Blumberg N, Heal JM. The transfusion immunomodulation theory: the Th1/Th2 paradigm and an analogy with pregnancy as a unifying mechanism [review]. *Semin Hematol* 1996; **33**: 329-40.
- 91) Sayegh MH, Carpenter CB. Role of indirect allorecognition in allograft rejection [review]. *Int Rev Immunol* 1996; **13**:221-9.
- 92) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; **66**: 233-43.
- 93) Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, et al. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4⁺ T cells. *Nature* 1995; **376**: 181-4.
- 94) van Parijs L, Abbas AK. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses [review]. *Curr Opin Immunol* 1996; **8**: 355-61.
- 95) Puppo F, Ghio M, Contini P, et al. Fas, Fas ligand, and transfusion immunomodulation [review]. *Transfusion* 2001; **41**: 416-8.
- 96) Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; **181**: 71-7.

- 97) Ju ST, Panka DJ, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995; **373**: 444-8.
- 98) Frabetti F, Musiani D, Marini M, et al. White cell apoptosis in packed red cells. *Transfusion* 1998; **38**: 1082-9.
- 99) Petranyi GG, Reti M, Harsanyi V, Szabo J. Immunologic consequences of blood transfusion and their clinical manifestations [review]. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; **114**: 303-15.
- 100) Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA. Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood* 1994; **84**: 1703-21.
- 101) Schlitt HJ. Is microchimerism needed for allograft tolerance? *Transplantation Proc* 1997; **29**:82-84
- 102) Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, et al. Chimerism and donor-specific nonreactivity 27 to 29 years after kidney allotransplantation. *Transplantation*. 1993; **55**:1272-7.
- 103) Lee T-H, Paglieroni T, Ohto H, et al. Survival of donor leukocyte subpopulations in immunocompetent transfusion recipients: frequent long-term microchimerism in severe trauma patients. *Blood* 1999; **93**: 3127-39.
- 104) Dizk WH. Mononuclear cell microchimerism and the immunomodulatory effect of transfusion. *Review. Transfusion* 1994; **34**:1007-12.
- 105) Triulzi DJ, Nalesnik MA. Microchimerism, GVHD, and tolerance in solid organ transplantation. [review]. *Transfusion*. 2001; **41**: 419-26.
- 106) Martelli AM, Tazzari PL, Bortol R, et al. Nuclear matrix protein is released from apoptotic white cells during cold (1-6 °C) storage of concentrated red cell units and might induce antibody response in multiply transfused patients. *Transfusion* 2000; **40**: 169-77.
- 107) Frabetti F, Tazzari PL, Musiani D, et al. White cell apoptosis in platelet concentrates. *Transfusion* 2000; **40**: 160-8
- 108) Voll RE, Herrmann M, Roth EA, et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997; **390**: 350-1.
- 109) Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 2000; **403**: 199-203.
- 110) Brown SB, Savill J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol* 1999; **162**, 480-5.
- 111) Hensler T, Heidecke CD, Hecker H, et al. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J Immunol*. 1998; **161**: 2655-9.
- 112) de Carvalho Bittencourt M, Perruche S, Contassot E, et al. Intravenous injection of apoptotic leukocytes enhances bone marrow engraftment across major histocompatibility barriers. *Blood* 2001; **98**: 224-30.
- 113) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. [review]. *Science*. 1995; **267**: 1449-56.
- 114) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, et al. Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg*. 1994; **129**: 39-45.
- 115) Moore FA, Moore EE, Sauaia A. Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch Surg*. 1997; **132**: 620-5.
- 116) Vamvakas EC, Carven JH. RBC transfusion and postoperative length of stay in the hospital or the intensive care unit among patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: the effects of confounding factors. *Transfusion*. 2000; **40**: 832-9.
- 117) Vamvakas EC, Carven JH. Transfusion and postoperative pneumonia in coronary artery bypass graft surgery: effect of the length of storage of transfused red cells. *Transfusion* 1999; **39**: 701-10.
- 118) Offner PJ, Moore EE, Biffl WL, et al. Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury. *Arch Surg* 2002; **137**: 711-7
- 119) Heddle NM. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Review Curr Opin Hematol* 1999; **6**: 420-6.
- 120) Muylle L, Joos M, Wouters E, et al. Increased tumour necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 1993; **33**: 195-9.
- 121) Kluter H, Schlenke P, Müller-Steinhardt M, et al. Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 1997; **37**: 362-7.
- 122) Snyder E, Napychank P, Baril L. Removal of complement component C3a and interleukin-8 from platelet concentrate by a bedside leukodepletion filter. *Transfusion* 1994; **34** (Suppl): 31S [abstract]
- 123) Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*. 1997; **90**: 2772-83.
- 124) Shen X, Hu B, McPhie P, et al. Peptides corresponding to CD4-interacting regions of murine MHC class II molecules modulate immune responses of CD4⁺ T lymphocytes in vitro and in vivo. *J Immunol* 1996; **157**: 87-100.