

Сравнение лабораторных показателей патогенредуцированных и рентгеноблученных эритроцитных взвесей

И.Б. Кумукова¹, П.Е. Трахтман¹, Н.Н. Старостин¹, Д.В. Борсакова^{1, 2},
А.А. Игнатова¹, А.Ю. Федотов¹, М.Е. Плахотник³, Ф.И. Атауллаханов^{1, 2, 3}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

² ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация:

Кумукова Ирина Борисовна,
врач-трансфузиолог НМИЦ детской
гематологии, онкологии и иммуноло-
гии им. Дмитрия Рогачева Минздрава
России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,
ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570
E-mail: irina_kumukova@mail.ru

Эффективная инактивация патогенов и лейкоцитов и безопасный токсикологический профиль цельной крови, обработанной технологией редукции патогенов с применением рибофлавина и ультрафиолета (RF + UV), описаны в литературе. Испытания такой крови на животных моделях и здоровых добровольцах продемонстрировали отсутствие неоантигенности и других серьезных проблем безопасности. Эритроцитные взвеси (ЭВ) готовят обычно из предварительно не обработанной цельной крови, а инактивацию патогенов и лейкоцитов в них проводят путем рентгеновского и гамма-облучения. Цель работы – сравнение качества ЭВ, полученных из цельной крови, предварительно обработанной RF + UV, и стандартно инактивированных рентгеновским облучением, а также установление срока возможного хранения ЭВ, полученных из крови, обработанной RF + UV. Образцы цельной крови (450 мл) были получены от здоровых доноров (n = 50). В день донации (день 0) 25 образцов подвергали инактивации патогенов с применением RF + UV (система инактивации патогенов *Mirasol*, *Terumo* BCT Inc.) с последующим выделением ЭВ (опытные образцы). Из остальных необлученных образцов цельной крови (n = 25) сначала были получены ЭВ, которые затем (в день 0) были инактивированы путем рентгеновского облучения в дозе 25 Гр (контрольные образцы). Все полученные ЭВ хранили при 6 ± 2 °C в растворе SAGM в течение 4 нед. Исследованы показатели: гематокрит, pH, концентрации общего и свободного гемоглобина, ионов калия, глюкозы, лактата, АТФ и восстановленного глутатиона, экспрессия фосфатидилсерина на мембранах эритроцитов, показатели гемолиза и осмотической резистентности клеток. Измерения проводили во всех образцах исходной цельной крови (до обработки в день 0) и в образцах контрольных (после обработки рентгеновским облучением) и опытных ЭВ в день 0, на 7, 14 и 21-й дни хранения. На 28-й день хранения проверяли только стерильность хранившихся ЭВ. В ходе хранения отмечены статистически значимое ухудшение осмотической резистентности эритроцитов, повышение гематокрита, концентрации лактата и более выраженный гемолиз клеток в опытной группе ЭВ по сравнению с контролем. Показатели общего гемоглобина, pH, концентрации внеклеточного калия, АТФ, глутатиона и экспрессии фосфатидилсерина не отличались между группами. Качество ЭВ (уровень гемолиза), полученных из обработанной RF + UV цельной крови и хранившихся в растворе SAGM, в течение 14 дней хранения оставалось приемлемым. Из-за более выраженного гемолиза клиническое использование этих взвесей после 14 дней хранения без дополнительных методов обработки (например, отмывания) невозможно.

Ключевые слова: вирусинактивация, патогенинактивация, рибофлавин, цельная кровь, ультрафиолет, эритроцитная взвесь.

Comparison of laboratory parameters of X-ray irradiated erythrocyte suspensions and suspensions, prepared from whole blood pre-treated with ultraviolet in the presence of riboflavin

I.B. Kumukova¹, P.E. Trakhtman¹, N.N. Starostin¹, D.V. Borsakova^{1, 2}, A.A. Ignatova¹, A.Yu. Fedotov¹,
M.E. Plakhotnik³, F.I. Ataullakhanov^{1, 2, 3}

¹ Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

² Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, RAS, Moscow

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow

The current data describe effective inactivation of pathogens and leukocytes and a safe toxicological profile of whole blood treated with pathogen reduction technology using riboflavin and ultraviolet (RF + UV). Trials on animals and healthy volunteers demonstrated a lack of neoantigen formation or other serious safety problems in such blood. Red blood cell (RBC) suspensions are usually prepared from untreated whole blood, and pathogens and leucocytes in these suspensions are inactivated with X-ray irradiation. The aims were to compare the quality of RBC suspensions prepared from whole blood pre-treated with RF + UV or irradiated with X-rays. To determine the shelf-life of the RBC suspensions prepared from blood pre-treated with RF + UV. Samples of whole blood (450 ml) were obtained from healthy donors (n = 50). On the day of donation, 25 samples were

Correspondence:

Irina B. Kumukova, transfusionist,
Dmitriy Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology, Immunology
Ministry of Healthcare of Russian
Federation.

Address: Russia 117997, Moscow,
Samory Mashela st., 1
Tel.: +7 (495) 287-6570
E-mail: irina_kumukova@mail.ru

treated with RF + UV (Mirasol, Terumo BCT Inc.) and RBC suspensions were then prepared. Control samples of RBC suspensions ($n = 25$) were prepared from untreated whole blood and then irradiated by X-rays at a dose of 25 Gy on day 0. All the resulting RBC suspensions were stored at $6 \pm 2^\circ \text{C}$ in SAGM solution for 4 weeks. The following parameters were studied: hematocrit, pH, the concentrations of total and free hemoglobin, potassium ions, glucose, lactate, ATP and reduced glutathione, as well as expression of phosphatidylserine on erythrocyte membranes, hemolysis and osmotic resistance of the cells. The measurements were carried out in all samples of the whole blood (without treatment on day 0), as well as in control RBC suspensions (after X-ray irradiation) and experimental RBC suspensions, prepared from blood pre-treated with RF + UV, on day 0, 7, 14 and 21. On the 28th day of storage, only the sterility of the stored RBC suspensions was tested. In the experimental group, compared with the control group of RBC suspensions, there was a statistically significant deterioration in osmotic resistance, an increase in hematocrit and lactate, and more severe hemolysis during storage. The concentration of total hemoglobin, extracellular potassium, ATP, glutathione as well as the pH values did not differ between groups. The quality of the RBC (hemolysis level) suspensions, prepared from whole blood samples, pre-treated with RF + UV and stored in SAGM, remained acceptable during 14 days of storage. Because of the level of hemolysis higher than allowed, the clinical use of these suspensions after 14 days of storage without additional methods of treatment (for example, washing) is impossible.

Key words: erythrocyte suspension, pathogen inactivation, riboflavin, ultraviolet, virus inactivation, whole blood.

Новейшие методы лабораторных исследований и скрининг доноров не исключают риска передачи различных инфекционных агентов при трансфузии, поэтому инфекционная безопасность компонентов крови остается нерешенной проблемой. В последние десятилетия активно внедряются различные технологии редукции патогенов (ТПП), ряд которых доказали свою эффективность и активно применяются для тромбоцитных концентратов и плазмы крови. Редукция патогенов в эритроцитных компонентах представляла значительные трудности из-за непрозрачности среды и относительной хрупкости эритроцитов. Две технологии, основанные на применении инактина PEN110 и амусталина AS-303, не прошли клиническую стадию испытаний из-за образования антител к обработанным эритроцитам [1–3]. Другая методика редукции патогенов в цельной крови основана на совместном действии рибофлавина и ультрафиолета (RF + UV). Рибофлавин связывается с нуклеиновыми кислотами и опосредует кислород-независимый процесс переноса электронов, приводящий к модификации нуклеиновых кислот, прежде всего их гуаниновых остатков, благодаря чему инактивируются остаточные лейкоциты и блокируется репликация микроорганизмов в компонентах крови [4–6]. Способность рибофлавина действовать как фотосенсибилизатор обеспечивает избирательное повреждение нуклеиновых кислот при воздействии ультрафиолета без связывания фотосенсибилизатора с клетками и белками [7]. Спектральный выход ультрафиолетовых ламп в данной технологии максимален на 313 нм. При этом более 99% общей энергии, достигающей продукта, попадает в области спектра UVB (280–315 нм) и UVA (315–400 нм) – это оптимальный диапазон для опосредованной рибофлавином фотосенсибилизации нуклеиновых кислот [7].

Известно, что сам рибофлавин безопасен, однако для определения безопасности препаратов крови, обработанных RF + UV, был проведен ряд дополнительных исследований. Токсичность рибофлавина и его фотопродуктов оценивали с использованием как *in vitro*, так и *in vivo* моделей.

При проведении исследований на обработанных тромбоцитных компонентах и плазме крови оценивали цитотоксичность, гемосовместимость, генотоксичность, острую и субхроническую системную токсичность, репродуктивную токсичность и выщелачиваемость экстрагируемых веществ. Никаких доказательств токсического эффекта не наблюдалось ни в одном из этих исследований [8].

Исследования цельной крови и эритроцитных компонентов, в том числе полученных из обработанной RF + UV цельной крови, также подтвердили отсутствие токсических эффектов и «неправильной» активации системы комплемента [8].

Эффективность редукции патогенов (вирусов, бактерий и простейших) с помощью RF + UV в концентратах тромбоцитов, плазме и цельной крови изучена в большом количестве работ. Различные микроорганизмы протестированы как в моделях *in vitro* (на культуре клеток) [9–12], так и в *in vivo* моделях [13]. Некоторые результаты редукции тестируемых патогенов в цельной крови приведены в таблице 1.

В тестах на вирусную инфекцию использовали модельные вирусы: собачий парвовирус, вирус везикулярного стоматита, вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, вирус голубого языка и HAV. Все вирусы были восприимчивы к инаktivации. При этом уровень редукции варьировал от 1,2 lg/мл для HAV до 4,5 lg/мл для вируса везикулярного стоматита [7]. Технология RF + UV – единственная ТПП, которая продемонстрировала инаktivацию вируса гепатита А (HAV), обладающего высокой устой-

чивостью к инаktivации химическими веществами и тепловой энергией [14].

Инаktivацию бактерий оценивали с применением наиболее распространенных штаммов бактерий, передающихся посредством трансфузии: *Y. enterocolitica*, *A. baumannii* и *S. liquefaciens*. При этом *Y. enterocolitica* и *S. liquefaciens* достигли нижних пределов обнаружения, а инаktivация *A. baumannii* составляла 80% [15]. При использовании клинически значимых уровней загрязнения обработка RF + UV также продемонстрировала общую эффективность 98% против *T. cruzi* и *B. Microti* [12–13].

Остаточные лейкоциты в продуктах крови могут при переливании реципиенту опосредовать ряд неблагоприятных иммунологических эффектов и вызывать посттрансфузионные осложнения. Лейкоредукция уменьшает количество этих лейкоцитов, но полностью не удаляет их из продуктов крови. Инаktivация остаточных донорских лейкоцитов имеет важное значение для предотвращения посттрансфузионной реакции трансплантат против хозяина (пТРТПХ). Было продемонстрировано [16–18], что обработка RF + UV столь же эффективно инаktivует лейкоциты, как гамма-облучение. Кроме того, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что лейкоциты, обработанные RF + UV, не способны связываться с аллогенными клетками или стимулировать их [19]. Применение данной ТРП предотвращало аллоиммунизацию на животной модели [20], а также было ассоциировано с большим посттрансфузионным приростом тромбоцитов и снижением количества трансфузий [18]. Обработка RF + UV приводит также к снижению продукции цитокинов (TNF- α , IL-6 и IL-8) лейкоцитами, что потенциально снижает частоту посттрансфузионных фебрильных негемолитических реакций [17, 21].

Тромбоцитные концентраты и плазма, полученные из обработанной RF + UV цельной крови, име-

ют адекватные значения pH и лабильных факторов свертывания крови. Среднее значение pH в концентратах тромбоцитов в течение 5 дней хранения соответствовало требованиям AABB. Не наблюдались потери тромбоцитов во время хранения. Обработка RF + UV не влияла на общее содержание белка в плазме крови [22].

В клиническом испытании MEDIC WB оценивали восстановление и выживание тромбоцитов, полученных из цельной крови, обработанной RF + UV. Средний посттрансфузионный прирост тромбоцитов, полученных из обработанной цельной крови, составил 82,9%, а средняя выживаемость – 82% по сравнению с тромбоцитами, полученными из необработанной крови. Эти результаты значительно выше критериев FDA для прироста (66,7% по сравнению со свежим контролем) и выживаемости (58% по сравнению со свежим контролем) тромбоцитов [23].

На животных моделях показана хорошая переносимость цельной крови, обработанной RF + UV. Не отмечено тяжелых посттрансфузионных реакций, ухудшения параметров доставки кислорода в ткани, клинических показателей коагуляции, увеличения заболеваемости или смертности животных, а также неоантигенных свойств по сравнению с необработанной кровью [24–26].

Что касается качества эритроцитов, обработанных RF + UV, то, согласно литературным данным, все критерии приемлемости, основанные на стандартах AABB, были удовлетворены: гемолиз оставался ниже 1%; pH $\geq 6,2$; перекрестные пробы с необработанной аутологичной плазмой демонстрировали совместимость. В эритроцитных компонентах, полученных из обработанной RF + UV цельной крови, отмечена более высокая концентрация внеклеточного калия, чем в необработанных образцах; разница в концентрации калия аналогична той, которая наблюдается при хранении рентген-облученных эритроцитов [9].

В качестве критерия эффективной трансфузии эритроцитных компонентов FDA установил восстановление более 75% количества эритроцитов после трансфузии (измеренное с помощью ^{51}Cr -меченных эритроцитов). Клинические испытания IMPROVE и IMPROVE II, проведенные на здоровых добровольцах, показали приемлемое качество клеток в эритроцитных компонентах, обработанных RF + UV, и соответствие их посттрансфузионным критериям FDA. Кроме того, в отношении этих клеток не обнаружено доказательств неоантигенности или других серьезных проблем безопасности [22, 27].

Двойное слепое параллельное групповое рандомизированное исследование AIMS продемонстрировало большую вероятность возникновения посттрансфузионной малярии у пациентов после переливания необработанной цельной крови по срав-

Таблица 1

Редукция патогенов в цельной крови с помощью ТРП RF + UV*

Вирусы [7]	Логарифм редукции	Паразиты [10–13]	Логарифм редукции	Бактерии [9]	Логарифм редукции
HIV	2,7	<i>B. microti</i>	$\geq 5,0$	<i>B. cereus</i>	5,3
HAV	1,2	<i>B. divergens</i>	7,3	<i>E. coli</i>	4,9
VSV	4,5	<i>L. donovani</i>	2,3	<i>K. pneumoniae</i>	5,0
		<i>P. falciparum</i>	$\geq 6,4$	<i>S. aureus</i>	4,1
		<i>T. cruzi</i>	$\geq 3,5$	<i>S. epidermidis</i>	3,2
				<i>S. liquefaciens</i>	5,9
				<i>S. pyogenes</i>	$\geq 5,1$
				<i>Y. enterocolitica</i>	4,4

* Логарифм редукции – это уменьшение десятичного логарифма числа бактерий в 1 мл образца после обработки; HIV – вирус иммунодефицита человека; HAV – вирус гепатита А; VSV – вирус везикулярного стоматита.

нению с кровью, обработанной RF + UV, – 22 и 4% соответственно ($p = 0,039$). Частота тяжелых побочных реакций не отличалась между группами пациентов, а частота аллергических и фебрильных негемолитических посттрансфузионных реакций была ниже в группе пациентов, получавших обработанную цельную кровь, хотя разница не достигала статистической достоверности [28].

Мы провели собственное открытое, параллельное, нерандомизированное исследование лабораторных параметров эритроцитной взвеси, полученной из цельной крови, обработанной технологией RF + UV, и сравнили эти данные с показателями стандартной рентген-облученной эритроцитной взвеси.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий дизайн экспериментов. Цельную кровь 50 здоровых доноров забирали в объеме 450 ± 20 мл в контейнеры с антикоагулянтом CPD (IMUFLEX-WB-RP, Terumo, Бельгия), затем подвергали лейкофильтрации.

Образцы цельной крови, включенные в экспериментальную группу ($n = 25$), подвергали процедуре инактивации патогенов методом RF + UV (система инактивации патогенов Mirasol® PRT, Terumo, Caridian BCT Biotechnologies, Lakewood, CO, USA). Цельную кровь переносили в контейнер для облучения, добавляли 35 мл 500 мкМ раствора рибофлавина и облучали УФ в дозе 80 Дж/мл эритроцитов согласно протоколу обработки. Затем цельную кровь переносили в контейнер для хранения и проводили стандартную процедуру фракционирования до эритроцитной массы и плазмы крови. К полученной эритроцитной массе добавляли 100 мл консервирующего раствора SAGM (IMUFLEX-WB-RP, Terumo, Бельгия), полученную эритроцитную взвесь хранили при 6 ± 2 °C.

Из других образцов цельной крови ($n = 25$), составивших контрольную группу, были получены сначала по стандартной методике образцы эритроцитной взвеси в растворе SAGM (IMUFLEX-WB-RP, Terumo, Бельгия), которые затем подвергали рентгеновскому облучению на аппарате «АРДОК-1» (ООО НПП «Велит», г. Истра, Россия) в дозе 25 Гр.

Все образцы эритроцитных взвесей хранили в холодильнике при температуре 6 ± 2 °C в течение 28 дней. Отбор проб проводили из всех образцов цельной крови (без обработки) после лейкофильтрации (день 0), а также из опытных (без дополнительной обработки) и контрольных (после рентгеновского облучения) образцов эритроцитной взвеси в день 0 и на 7, 14, 21 и 28-й дни хранения. Образцы эритроцитных взвесей в день 0 и на 28-й день хранения были проверены только на стерильность.

Измерение количества лейкоцитов, гематокрита и концентрации гемоглобина в пробах. Количество остаточных лейкоцитов подсчитывали с использованием набора BD Leucocount™ Kit (BD Biosciences, США) на проточном цитометре BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США) с программным обеспечением BD FACS Diva Software.

Концентрацию гемоглобина и гематокрит образцов определяли с помощью гематологического анализатора Sysmex KX-21N (Sysmex Corporation, Япония). Концентрацию внеклеточного калия измеряли на биохимическом анализаторе Cobas 4000 c311 (Roche/Hitachi, Германия). Значение pH, концентрацию глюкозы и лактата определяли на анализаторе газов крови ABL800 FLEX (Radiometer, Дания).

Концентрацию свободного гемоглобина определяли на анализаторе HemoCue Plasma/Low Hb (HemoCue AB, Швеция). На основе полученного показателя свободного гемоглобина, а также значений гематокрита и полной концентрации гемоглобина вычисляли процент гемолиза по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = [(1 - \text{Hct}) \times \text{свободный Hb (г/дл)} \times 100] / \text{полная концентрация Hb (г/дл)}$$

Исследование образцов на стерильность. Исследование образцов суспензий на стерильность проводили сразу после обработки в день 0, а также на 28-й день хранения с применением сред для гемокультивирования BACTEC Peds Plus/F (BECTON DICKINSON, США) и бактериологического анализатора BACTEC-9050 (BECTON DICKINSON, США).

Измерение кривой осмотической резистентности эритроцитов. Для измерения осмотической резистентности пробы цельной крови и эритроцитной взвеси разводили в PBS до гематокрита 5%. Измерения проводили по методике, описанной в [29]. В лунки 96-луночного планшета вносили растворы с различной осмоляльностью (0 – вода, 30, 59, 92, 121, 131, 156, 181, 211, 243 и 297 мОсм/кг; pH 7,4) в объеме 300 мкл. В каждую лунку добавляли по 6 мкл пробы (с гематокритом 5%). Полученные суспензии инкубировали 30 мин при комнатной температуре, затем в каждую лунку для восстановления нормальной тоничности вносили по 40 мкл гипертонического раствора, содержащего 96,2 мМ Na_2HPO_4 , 15,6 мМ NaH_2PO_4 и 1,54 М NaCl (pH 7,4) и сразу измеряли оптическую плотность проб на длине волны 620 нм на планшетном спектрофотометрическом ридере Anthos Zenyth 340 rt (Biochrom, Великобритания). На данной длине волны поглощение оптической плотности гемоглобином отсутствует, поэтому измеряемая оптическая плотность зависит только от светорассеяния сохранившихся в пробе целых клеток. Процент нелизированных клеток определяли как

отношение (%) оптической плотности, измеренной в конкретной пробе, к оптической плотности той же пробы при нулевом лизисе (в растворе с физиологической осмоляльностью). Полученную кривую осмотической резистентности характеризовали значением осмоляльности раствора, при котором 50% исходных клеток было лизировано (H_{50}), а также значением ширины распределения клеток по их способности к лизису (W), характеризовавшемся разностью осмоляльностей, при которых в данном образце наблюдалось 10 и 90% лизиса клеток.

Измерение АТФ. Для измерения концентрации АТФ были приготовлены перхлорные экстракты: к 0,25 мл цельной крови или смеси из 0,125 мл эритроцитной взвеси (с известным гематокритом) + 0,125 мл PBS добавляли 0,5 мл 0,5 М перхлорной кислоты. Тщательно перемешивали и нейтрализовали pH полученной смеси до значения 7–8,5, добавляя к пробе 70 мкл 5 М раствора K_2CO_3 . Пробу центрифугировали 5 мин при 1000 g. Надосадок быстро замораживали и хранили при $-80^\circ C$ до дальнейших измерений. Определение проводили по методике [30], основанной на сопряженных реакциях, катализируемых гексокиназой и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой, путем измерения оптической плотности НАДФН на длине волны 340 нм на микропланшетном фотометре *Anthos Zenyth 340 rt* (*Biochrom*, Великобритания). Состав среды для измерения: 50 мМ HEPES (pH 7,4); 0,35 мМ НАДФ; 6,5 мМ $MgCl_2$; 50 мМ глюкозы; 0,47 МЕ/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы; 1,8 МЕ/мл гексокиназы.

Измерение восстановленного глутатиона. Для измерения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) образцы суспензий эритроцитов с известным гематокритом быстро замораживали и хранили при температуре $-80^\circ C$ до дальнейших измерений. Перед измерением образцы размораживали и готовили из них безбелковые экстракты путем добавления к 100 мкл образца (крови или эритроцитной взвеси) 1 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора, содержащего 16,7 мг/мл метафосфорной кислоты; 2 мг/мл ЭДТА; 300 мг/мл NaCl. Экстракты перемешивали в течение 2 мин и центрифугировали 5 мин при 1000 g. Надосадок использовали для измерения. Измерение проводили по методике, описанной в [31]. Метод основан на реакции сульфгидрильной группы восстановленного глутатиона с 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислотой, сопровождающейся образованием яркоокрашенного продукта 2-нитро-5-тиобензойной кислоты. Состав среды для измерения: 0,38 мМ раствор 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислоты; 230 мМ Na_2HPO_4 ; pH 8,3. К 275 мкл этой смеси добавляли 65 мкл экстракта пробы и сразу после этого измеряли оптическую плотность на длине волны 405 нм на приборе *Anthos Zenyth 340 rt*

(*Biochrom*, Великобритания). В качестве контроля использовали кювету со средой, где образец был заменен раствором метафосфорной кислоты. Концентрацию GSH вычисляли с помощью коэффициента экстинкции 2-нитро-5-тиобензойной кислоты при длине волны 405 нм ($13\text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

Измерение экспрессии фосфатидилсерина мембранами эритроцитов. Экспрессию фосфатидилсерина (ФС) определяли по связыванию аннексина V эритроцитами. Эритроцитную взвесь разбавляли в 1000 раз буфером – 10 мМ HEPES; 150 мМ NaCl; 2,5 мМ $CaCl_2$; pH 7,4 (*Sigma-Aldrich*, США). К 40 мкл полученной суспензии эритроцитов в буфере добавляли 2 мкл аннексина V, конъюгированного с *Alexa Fluor 647* (*Sony Biotechnology*, США) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем разбавляли тем же буфером в 10 раз и анализировали на проточном цитометре *Novocyte* (*Acea Bioscience*, США). В качестве отрицательного контроля инкубацию с аннексином V проводили в присутствии 2 мМ ЭДТА. В качестве положительного контроля эритроцитную взвесь разбавляли буфером в 1000 раз и инкубировали с 10 мкМ кальциевого ионофора A23187 30 мин, а затем добавляли аннексин V.

Статистический анализ. Статистический анализ показателей цельной крови до обработки выполнен с использованием непарного двустороннего t -критерия Стьюдента с уровнем статистической значимости $\alpha = 0,05$. Результаты лабораторных исследований контрольной и экспериментальной групп образцов эритроцитной взвеси в различные дни хранения исследованы с использованием дисперсионного анализа с повторными измерениями ANOVA (уровень значимости $\alpha = 0,05$) и использованием метода *Sidak* для коррекции множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усредненные значения всех исследованных параметров для контрольных ($n = 25$) и опытных ($n = 25$) образцов эритроцитных взвесей на разных сроках хранения представлены в *таблице 2* как средние величины $\pm$ стандартные отклонения. Величины исходных объемов образцов и количество остаточных лейкоцитов в них, а также значения всех других измеряемых параметров цельной крови в обеих группах до обработки в день 0 достоверно не различались. Достоверные различия для контрольных и опытных образцов эритроцитных взвесей в день 0 наблюдались только в концентрации глюкозы, которая оказалась несколько выше в контрольной группе. В последующие дни хранения в обеих группах отмечено прогрессирующее снижение pH , концентрации глюкозы, АТФ, GSH и одновременное повышение концентрации лактата, внеклеточного калия, свободного гемогло-

Таблица 2

Изменения в ходе хранения параметров эритроцитарных взвесей, полученных из цельной крови и подвергнутых затем рентгеновскому облучению (контроль) либо полученных из цельной крови после ее обработки RF + UV (опыт)¹

Параметр ²	День 0		День 7		День 14		День 21	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
Hb, г/л	197,8 ± 11,7	197,9 ± 9,8	198,3 ± 11,7	198,6 ± 9,5	199,0 ± 10,4	198,8 ± 9,8	199,2 ± 11,7	198,3 ± 9,4
Hct, %	59,0 ± 2,1	59,5 ± 2,3	59,5 ± 2,3	61,2 ± 2,7	61,9 ± 2,3	64,4 ± 3,0*	63,3 ± 2,4	66,5 ± 3,1*
pH	7,00 ± 0,05	7,00 ± 0,05	6,76 ± 0,21	6,77 ± 0,04	6,67 ± 0,03	6,63 ± 0,04	6,57 ± 0,05	6,55 ± 0,03
K ⁺ , мМ	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3	45,0 ± 4,1	45,2 ± 4,8	51,6 ± 5,3	51,7 ± 5,1	65,1 ± 4,6	64,7 ± 4,2
Своб. Hb, г/л	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,6	1,5 ± 0,4	2,2 ± 1,0*	2,0 ± 0,6	4,4 ± 2,2*
Гемолиз, %	0,08 ± 0,13	0,02 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,09	0,28 ± 0,07	0,38 ± 0,12*	0,36 ± 0,10	0,72 ± 0,37*
АТФ, ммоль/л эр.	1,12 ± 0,38	1,19 ± 0,33	1,09 ± 0,26	1,14 ± 0,23	1,08 ± 0,24	1,02 ± 0,21	0,90 ± 0,26	0,81 ± 0,24
GSH, моль/л эр.	2,33 ± 0,35	2,34 ± 0,35	2,38 ± 0,52	2,27 ± 0,35	2,16 ± 0,39	2,10 ± 0,30	1,98 ± 0,34	1,96 ± 0,33
Аннексин V, %	0,22 ± 0,11	0,23 ± 0,17	0,29 ± 0,22	0,24 ± 0,16	0,45 ± 0,42	0,32 ± 0,27	0,21 ± 0,14	0,51 ± 0,50*
Глюкоза, мМ	28,3 ± 1,2	26,9 ± 1,1*	23,7 ± 1,4	22,0 ± 1,5*	20,4 ± 1,4	19,0 ± 1,5*	17,9 ± 2,0	16,8 ± 1,8*
Лактат, мМ	3,4 ± 0,5	3,1 ± 0,5	12,3 ± 1,5	9,5 ± 2,0*	18,8 ± 2,2	15,4 ± 2,9*	22,0 ± 1,9	19,9 ± 3,1*
ОР (H ₅₀), мОсм/кг	138,8 ± 4,3	140,3 ± 5,1	136,4 ± 4,9	142,2 ± 7,1*	138,6 ± 4,9	148,4 ± 8,2*	141,2 ± 5,4	155,3 ± 8,4*
ОР (W), мОсм/кг	32,8 ± 9,5	36,3 ± 9,1	60,4 ± 19	56,3 ± 22,1	64,5 ± 15,4	68,8 ± 22,3	73,7 ± 23,3	74,5 ± 17,7

¹ Для всех параметров представлены средние величины ± стандартные отклонения. Для каждой группы n = 25.

² Hb – гемоглобин; Hct – гематокрит; K⁺ – ионы калия; своб. Hb – свободный гемоглобин; ммоль/л эр. – ммоль/л эритроцитов; GSH – восстановленный глутатион; ОР – осмотическая резистентность; H₅₀ – осмоляльность, при которой 50% клеток лизировано; W – ширина распределения эритроцитов в суспензии по устойчивости к лизису (разность осмоляльностей, при которых 10 и 90% клеток лизированы).

* Различия между опытной и соответствующей контрольной группой достоверны (ANOVA, p < 0,05).

бина, процента гемолиза и гематокрита. Значимых изменений экспрессии фосфатидилсерина внутри каждой из групп в ходе всего срока хранения не происходило. Не было обнаружено никаких статистически значимых различий между группами при любых сроках хранения суспензий для pH, концентраций общего гемоглобина, калия, АТФ и GSH (табл. 2). Концентрации глюкозы и лактата были достоверно ниже в опытных группах по сравнению с контрольными на всех сроках хранения суспензий, за исключением нулевого дня в случае лактата (рис. 1 А, Б).

Осмотическая устойчивость в опытных группах при всех сроках хранения была ниже, чем в соответствующих контрольных группах, за исключением нулевого дня. Лизис 50% клеток в этих группах был достигнут при меньшем снижении осмоляльности относительно нормы (то есть величины H₅₀ были выше в опытных группах) (рис. 1 В). В то же время ширина распределения эритроцитов по осмотической устойчивости (разность осмоляльностей, при которых наблюдается 10 и 90% лизиса эритроцитов) не различалась достоверно ни в одной из контрольных точек.

Наблюдалось статистически значимое увеличение гематокрита в экспериментальной группе по сравнению с контролем на 14 и 21-й дни хранения эритроцитарных взвесей (рис. 1 Г). На этих же сроках хранения в экспериментальной группе обнаружено статистически значимое превышение свободного гемоглобина и процента гемолиза (рис. 2), при этом на 14-й день хранения ни один из образцов в обеих группах не имел значения гемолиза, равного или

превышающего 0,8% (рис. 2). На 21-й день хранения в контрольной группе ни один из образцов по-прежнему не достиг порогового значения гемолиза, а в экспериментальной группе у 9 (36%) образцов значение гемолиза было равно или более 0,8%.

Экспрессия ФС, которую оценивали по проценту клеток, связавших аннексин V, была статистически выше в экспериментальной группе по сравнению с группой контроля только в 21-й день, что указывает на более высокий процент апоптотических клеток. При этом средний процент связывания аннексина V в контрольной группе на 14-й день оказался выше, чем на 21-й, что, по-видимому, связано с большим разбросом измеренных значений в 14-й день. Кроме того, не обнаружено статистически достоверных внутригрупповых изменений экспрессии ФС в обеих группах (рис. 3).

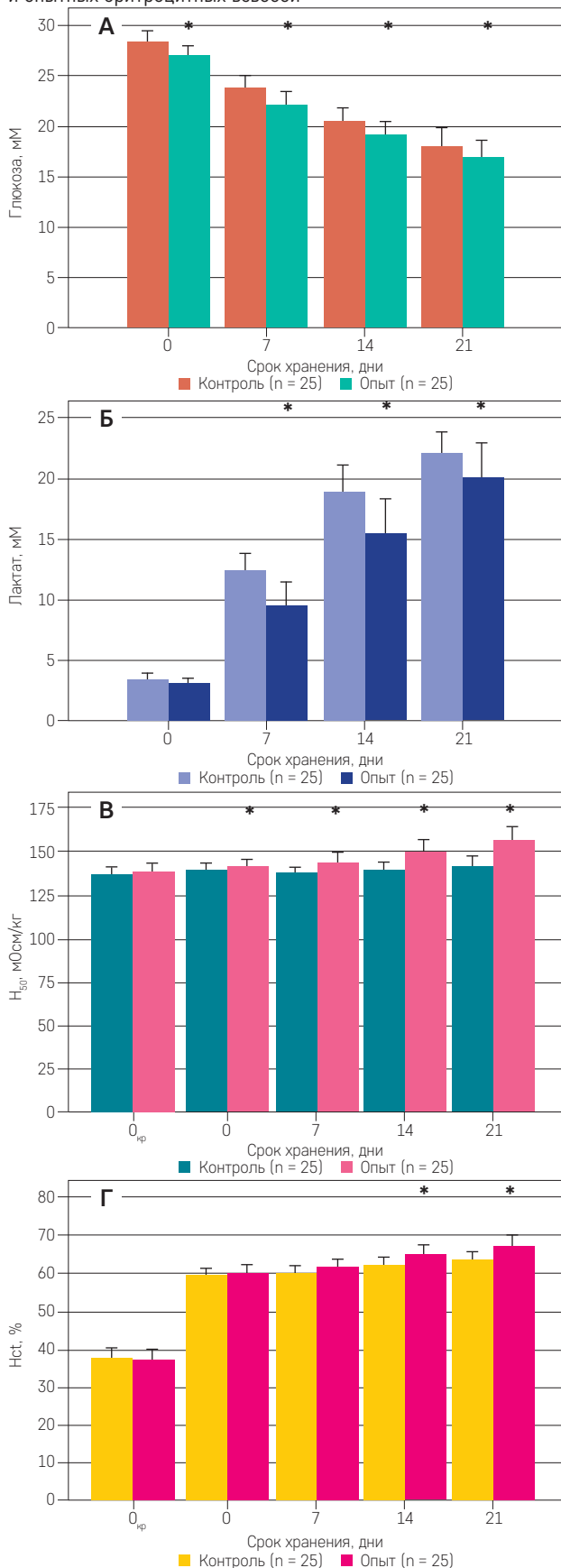
Все образцы как в экспериментальной, так и контрольной группе были отрицательны на наличие бактериальной культуры в день 0 и день 28.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повреждение, обусловленное хранением, представляет собой совокупность изменений, происходящих в компонентах крови вне человеческого тела (ex vivo). Этот процесс демонстрирует прогрессирующую деградацию компонентов крови, которая происходит при последовательных манипуляциях (сбор, лейкофилтрация, замораживание, размораживание и др.). Использование дополнительных методов обра-

Рисунок 1

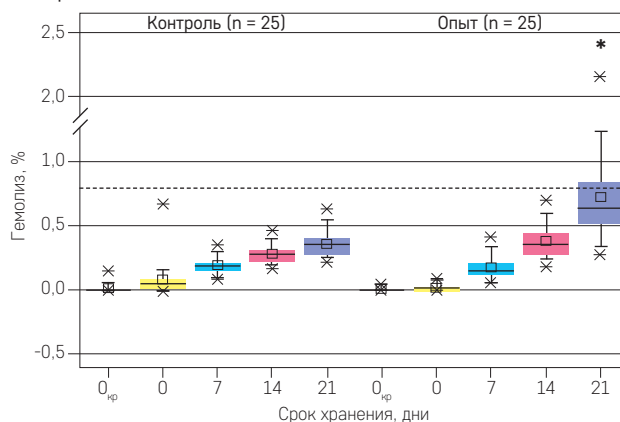
Изменение концентраций глюкозы (А), лактата (Б) и уровня осмоляльности, при котором наблюдается 50%-й гемолиз (В) и увеличение гематокрита (Г) в ходе хранения контрольных и опытных эритроцитных взвесей



Примечание: 0_{кр} – соответствуют величинам параметров, измеренных в день 0 в цельной крови без обработки; * различие между опытной и соответствующей контрольной группой достоверно (ANOVA; $p < 0,05$).

Рисунок 2

Изменения уровня гемолиза при хранении контрольных (гамма-облученных после приготовления в день 0) и опытных эритроцитарных взвесей, полученных из предварительно обработанной ТРП RF + UV в день 0 цельной крови. Размер бокса соответствует области значений, включающей от 25 до 75 перцентилей всех измеренных значений

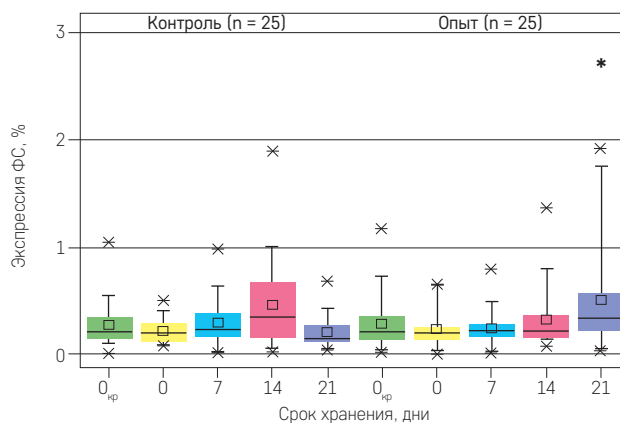


Примечание: представлены средние величины (обозначены квадратиком), медианы (горизонтальная линия), минимальное и максимальное значения (представлены размахом вертикальных линий) и область, включающая от 1 до 99% распределения всех возможных значений (представлена звездочками); пунктиром отмечен предельно допустимый для клинического использования уровень гемолиза в образцах; 0_{кр} – соответствуют величинам параметров, измеренных в день 0 в цельной крови без обработки.

* Различие между опытной и соответствующей контрольной группой достоверно (ANOVA; $p < 0,05$).

Рисунок 3

Экспрессия фосфатидилсерина, измеренная как связывание аннексина V с мембранами эритроцитов, в контрольной и опытной группах на различных сроках хранения эритроцитных взвесей. Размер бокса соответствует области значений, включающей от 25 до 75 перцентилей всех измеренных значений



Примечание: представлены средние величины (обозначены квадратиком), медианы (горизонтальная линия), минимальное и максимальное значения (представлены размахом вертикальных линий) и область, включающая от 1 до 99% распределения всех возможных значений (представлена звездочками); 0_{кр} – соответствуют величинам параметров, измеренных в день 0 в цельной крови без обработки.

* Различие между опытной и соответствующей контрольной группой достоверно (ANOVA; $p < 0,05$).

ботки, таких как облучение и инактивация патогенов, усиливает повреждение компонентов крови.

С целью оценки степени повреждения, обусловленного хранением, для эритроцитов был установлен широкий диапазон лабораторных показателей: гемолиз, концентрации калия, глюкозы, лактата, бикарбоната, 2,3-дифосфоглицерата, АТФ, газы крови, pH, средний объем эритроцитов или морфологический индекс (MCV) и др. [32]. Полученные нами результа-

ты демонстрируют типичные изменения, возникающие во время хранения эритроцитарных компонентов: снижение *pH*, концентрации глюкозы, GSH, АТФ, увеличение гемолиза, концентрации лактата, внеклеточного калия, ухудшение осмотической резистентности.

Гликолиз – единственный источник энергии для эритроцитов. В этом процессе происходит расщепление глюкозы до лактата и протонов с целью получения АТФ. Накапливающиеся протоны закисляют среду, замедляя гликолиз путем ингибирования фосфофруктокиназы, что приводит к прогрессирующему снижению продукции АТФ [32].

Согласно полученным данным, в опытной группе образцов достоверно снижена продукция лактата, что, возможно, является результатом низкого потребления глюкозы в данной группе. Однако различия в концентрации лактата не сопровождались статистически значимыми различиями *pH* между группами образцов во все дни хранения. Концентрация аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) – результирующего показателя энергетического обмена – прогрессивно снижалась во время хранения, но различий в концентрации между группами образцов, обработанными разными методами, не обнаружено.

Низкая температура хранения, помимо снижения активности гликолиза [33], отключает натрий-калиевый насос (Na-K-АТФазу), работа которого также зависит от АТФ. В результате калий по градиенту концентрации медленно вытекает из эритроцитов во внеклеточное пространство (супернатант) [32]. Высокая концентрация внеклеточного калия может иметь клинические последствия – стать причиной аритмии и внезапной сердечной смерти [34]. В наших экспериментах концентрация внеклеточного калия значительно увеличилась в процессе хранения, однако она не различалась между группами. Таким образом, можно предположить, что риск посттрансфузионной гиперкалиемии после переливания патогенредуцированной эритроцитарной взвеси соответствует таковому после трансфузии облученной рентгеном эритроцитарной взвеси тех же сроков хранения.

В процессе хранения уменьшается концентрация восстановленного глутатиона – вещества, выполняющего функцию антиоксидантной защиты в эритроцитах [35]. При снижении антиоксидантной защиты и в условиях повышенного производства активных форм кислорода происходит перекисное окисление липидов и белков, что может привести к потере частей эритроцитарной мембраны в виде микровезикул [36, 37]. В нашем исследовании различия в концентрации глутатиона между контрольными и опытными группами не достигли статистической значимости за 21 день хранения. Таким образом, вероятно, антиоксидантная защита эритроцитов опытной группы

образцов сохраняется на том же уровне, что и у рентген-облученных эритроцитов.

Как известно, экстернализация ФС – признак эритроптоза (запрограммированной гибели эритроцитов) [38, 39] и может вносить вклад в прокоагулянтную и провоспалительную активность эритроцитов *in vivo* [40–42]. ФС на эритроцитах распознается макрофагами ретикулоэндотелиальной системы, которые улавливают и фагоцитируют такие эритроциты [38, 39]. По этой причине экспрессия ФС на эритроцитах может стать причиной быстрого их клиренса из циркуляции после трансфузии [43, 44].

Согласно нашим результатам, средний процент связывания аннексина V не превышал 1% во все дни хранения. Учитывая малые значения средней величины и сравнительно большие значения стандартного отклонения, невозможно определить какой-либо закономерности изменения значений в динамике внутри групп. В работе S.M. Qadri и соавт. [45] также не обнаружено значительного изменения экспрессии ФС на эритроцитах до 21-го дня хранения при сравнении с необработанными эритроцитами. Они указывают, что выраженные различия между группами с более высокой экспрессией ФС в группе обработанных RF + UV эритроцитов обнаруживали только к 42-му дню хранения.

Гематокрит представляет собой показатель, характеризующий процент объема, занимаемый в крови эритроцитами, и обычно выражен в процентах от объема образца цельной крови [46]. Метаболические изменения, происходящие во время хранения, приводят к потере части мембраны в виде микровезикул и отеку клеток, что сопровождается уменьшением отношения площади поверхности эритроцита к его объему. В результате изменяется форма эритроцитов: возникает сфероцитарная и эхиноцитарная морфология клеток. Сфероциты занимают большее пространство в единице объема, чем дискоциты, а эхиноциты с множеством мембранных выступов мешают нормальной упаковке эритроцитов. Кроме того, в выступах эхиноцитов удерживается часть плазмы, что может приводить к возрастанию значения гематокрита на 1–3% [47]. В своем исследовании [45] авторы описывают, что объем эритроцитов, обработанных RF + UV, был значительно больше по сравнению с необработанными эритроцитами. Это указывает на то, что данный вид обработки вызывает выраженный отек клеток [45].

Наши результаты демонстрируют, что изменение гематокрита в ходе хранения более выражено в группе образцов, полученных из цельной крови, обработанной RF + UV, что может свидетельствовать о более выраженных морфологических изменениях этих эритроцитов [36]. Морфологические изменения эритроцитов потенциально могут иметь клинические

последствия. Так, авторы работы [48] описали, что изменения формы эритроцитов, наблюдаемые при хранении, ассоциированы с изменением реологических свойств, повышенной вязкостью и уменьшенным потоком крови в капиллярных системах.

Осмотическая резистентность демонстрирует устойчивость эритроцитов к осмотическому стрессу. В условиях повышенной активности перекисного окисления и микровезикуляции мембраны осмотическая резистентность снижается, то есть эритроциты становятся более восприимчивы к осмотическому стрессу и гемолизируются в растворах с большей осмоляльностью [36]. Мы обнаружили статистически значимые межгрупповые различия в осмотической резистентности эритроцитов уже на 7-й день хранения, что может свидетельствовать в пользу большей склонности эритроцитов экспериментальной группы к гемолизу уже на столь ранних сроках хранения.

Приемлемое качество эритроцитных компонентов, полученных с применением технологии RF + UV, подобное тому, которое наблюдается у рентген-облученных эритроцитов, описано ранее [9]. Было также показано, что качество плазмы крови и тромбоцитного концентрата, полученных из RF + UV-обработанной крови, соответствует мировым критериям качества [49, 50].

Согласно описанным литературным данным, ТРП RF+UV, помимо хорошей активности против различных инфекционных агентов [9–13], обеспечивает инактивацию лейкоцитов, сравнимую с таковой при использовании рентгеновского облучения [16, 17, 21], а значит, можно сделать вывод, что обработка цельной крови с помощью ТРП RF + UV может стать альтернативой рентгеновскому облучению компонентов крови. Кроме того, возможность получения в одноэтапной процедуре из одной дозы цельной крови трех патогенредуцированных компонентов (эритроцитная взвесь, плазма крови, тромбоцитный концентрат) снижает нагрузку на медицинский персонал и материальные затраты по сравнению с отдельной обработкой компонентов крови [51].

«Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» (утвержденный Постановлением Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 29) устанавливает для эритроцитной взвеси, обедненной лейкоцитами, допустимый процент гемолиза менее 0,8% [52]. Таким образом, основной параметр, лимитирующий срок хранения патогенредуцированной эритроцитной взвеси, – уровень гемолиза в образцах. По нашим данным, межгрупповые различия в степени гемолиза были статистически значимы уже к 14-му дню хранения, но пороговое значение в опытной группе образцов обнаруживали

только на 21-й день хранения. Это значит, что эритроцитная взвесь в консервирующем растворе SAGM, полученная из цельной крови, обработанной RF + UV, может быть использована в течение не более 14 дней хранения без применения отмывания. Примечательно, что, по данным *P. Schubert и соавт.* [49], образцы патогенинактивированной эритроцитной взвеси, хранившейся в растворе AS-3, имели значения гемолиза менее 0,8% вплоть до 21-го дня хранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лабораторные показатели дают общую картину качества компонентов крови и помогают выдвинуть предположения о возможных последствиях их применения. Считается, что повреждение, обусловленное хранением, снижает эффективность хранимой крови и уменьшает ее способность выполнять свою функцию после переливания, но эти гипотезы пока не имеют явных доказательств [53]. Поэтому, помимо определения характеристик компонентов крови *in vitro*, всегда необходима оценка их клинической безопасности и эффективности.

Риск заражения различными инфекционными агентами и пТРТПХ – серьезная угроза с возможными тяжелыми последствиями вплоть до летального исхода. Имеющиеся литературные данные предоставляют информацию о хорошем качестве и хорошей переносимости компонентов крови, полученных из цельной крови, обработанной RF + UV. Эффективная редукция патогенов, инактивация лейкоцитов и хорошее качество полученных компонентов крови обеспечивают потенциал применения данной методики в клинической практике. Однако для решения вопроса о безопасности и эффективном применении этой технологии необходим ряд исследований на различных группах пациентов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Системы для инактивации патогенов «Мирасол» были предоставлены фирмой *Terumo, Caridian BCT Biotechnologies, Lakewood, CO, USA*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

И.Б. Кумукова <http://orcid.org/0000-0002-9881-1041>

П.Е. Трахтман <http://orcid.org/0000-0002-0231-1617>

Н.Н. Старостин <http://orcid.org/0000-0002-1219-8654>

Д.В. Борсакова <http://orcid.org/0000-0003-4669-977X>

А.А. Игнатова <http://orcid.org/0000-0002-5217-3937>

А.Ю. Федотов <http://orcid.org/0000-0002-9204-7935>

М.Е. Плахотник <http://orcid.org/0000-0001-6281-3152>

Ф.И. Атауллаханов <http://orcid.org/0000-0003-3403-181X>

Литература

- Klein H.G., Glynn S.A., Ness P.M., Blajchman M.A. Research opportunities for pathogen reduction/inactivation of blood components: summary of an NHLBI workshop. *Transfusion* 2009; 49 (6): 1262–8.
- Benjamin R.J., McCullough J., Mintz P.D., Snyder E., Spotnitz W.D., Rizzo R.J., et al. Therapeutic efficacy and safety of red blood cells treated with a chemical process (S-303) for pathogen inactivation: a Phase III clinical trial in cardiac surgery patients. *Transfusion* 2005; 45 (11): 1739–49.
- Conlan M.G., Stassinopoulos A., Garratty G., Wages D., Corash L., Wood L., et al. Antibody formation to S-303-treated RBCs in the setting of chronic RBC transfusion. *Blood* 2004; 104 (11): 382. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/104/11/382>.
- Kasai H., Yamaizumi Z., Yamamoto F., Bessho T., Nishimura S., Berger M., et al. Photosensitized formation of 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in DNA by riboflavin. *Nucleic Acids Symp Ser* 1992; (27): 181–2.
- Korycka-Dahl M., Richardson T. Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin, and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochim Biophys Acta* 1980; 610 (2): 229–34.
- Kuratomi K., Kobayashi Y. Studies on the interactions between DNA and flavins. *Biochim Biophys Acta* 1977; 476 (3): 207–17.
- Goodrich R.P., Platz M.S. The design and development of selective, photoactivated drugs for sterilization of blood products. *Drugs Future* 1997; 22 (2): 159–71.
- Reddy H.L., Dayan A.D., Cavagnaro J., Gad S., Li J., Goodrich R.P. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfus Med Rev* 2008; 22 (2): 133–53.
- Yonemura S., Doane S., Keil S., Goodrich R., Pidcock H., Cardoso M. Improving the safety of whole blood-derived transfusion products with a riboflavin-based pathogen reduction technology. *Blood Transfus* 2017; 15 (4): 357–64.
- Owusu-Ofori S., Kusi J., Owusu-Ofori A., Freimanis G., Olver C., Martinez C.R., et al. Treatment of whole blood with riboflavin and UV light: impact on malaria parasite viability and whole blood storage. *Shock* 2015; 44 (Suppl 1): 33–8.
- Tonnetti L., Thorp A.M., Reddy H.L., Keil S.D., Doane S.K., Goodrich R.P., et al. Reduction of *Leishmania donovani* infectivity in whole blood using riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion* 2015; 55 (2): 326–9.
- Tonnetti L., Thorp A.M., Reddy H.L., Keil S.D., Goodrich R.P., Leiby D.A. Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and ultraviolet light for whole blood. *Transfusion* 2012; 52 (2): 409–16.
- Tonnetti L., Thorp A.M., Reddy H.L., Keil S.D., Goodrich R.P., Leiby D.A. Riboflavin and ultraviolet light reduce the infectivity of *Babesia microti* in whole blood. *Transfusion* 2013; 53 (4): 860–7.
- McDonald C.P., Roy A., Mahajan P., Smith R., Charlett A., Barbara J.A. Relative values of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang* 2004; 86 (3): 178–82.
- Goodrich R.P., Gilmour D., Hovenga N., Keil S.D. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. *Transfusion* 2009; 49 (6): 1205–16.
- Fast L.D., DiLeone G., Cardarelli G., Li J., Goodrich R. Mirasol PRT treatment of donor white blood cells prevents the development of xenogeneic graft-versus-host disease in Rag2-/-gamma c-/-double knockout mice. *Transfusion* 2006; 46 (9): 1553–60.
- Fast L.D., DiLeone G., Marschner S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. *Transfusion* 2011; 51 (7): 1397–404.
- Marschner S., Fast L.D., Baldwin W.M. 3rd, Slichter S.J., Goodrich R.P. White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion* 2010; 50 (11): 2489–98.
- Jackman R., Heitman J., Marschner S., Goodrich R., Norris P.J. Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity following pathogen reduction: mechanisms of action in UV illumination and riboflavin treatment. *Transfusion* 2009; 49 (12): 2686–99.
- Asano H., Lee C.Y., Fox-Talbot K., Koh C.M., Erdinc M.M., Marschner S., et al. Treatment with riboflavin and ultraviolet light prevents alloimmunization to platelet transfusions and cardiac transplants. *Transplantation* 2007; 84 (9): 1174–82.
- Fast L.D., DiLeone G., Li J., Goodrich R. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 2006; 46 (4): 642–8.
- Cancelas J.A., Rugg N., Fletcher D., Pratt P.G., Worsham D.N., Dunn S.K., et al. In vivo viability of stored red blood cells derived from riboflavin plus ultraviolet light-treated whole blood. *Transfusion* 2011; 51 (7): 1460–8.
- Hervig T., Braathen H., Jaboori A.A., et al. Platelet recovery and survival after whole blood treated with mirasol pathogen reduction. *Transfusion* 2016; 56 (suppl 4), SP 434: 194A.
- Doane S.K., Yonemura S.S., Hovenga N., et al. Evaluation of the acute toxicity of red blood cells derived from riboflavin and UV light-treated whole blood in a canine red blood cell exchange model. *Transfusion* 2016; 56 (suppl 4), SP 432: 193A.
- Okoye O.T., Reddy H., Wong M.D., Doane S., Resnick S., Karamanos E., et al. Large animal evaluation of riboflavin and ultraviolet light-treated whole blood transfusion in a diffuse, nonsurgical bleeding porcine model. *Transfusion* 2015; 55 (3): 532–43.

26. Goodrich R.P., Murthy K.K., Doane S.K., Fitzpatrick C.N., Morrow L.S., Arndt P.A., et al. Evaluation of potential immune response and in vivo survival of riboflavin-ultraviolet light-treated red blood cells in baboons. *Transfusion* 2009; 49 (1): 64–74.
27. Cancelas J.A., Slichter S.J., Rugg N., Pratt P.G., Nestheide S., Corson J., et al. Red blood cells derived from whole blood treated with riboflavin and ultraviolet light maintain adequate survival in vivo after 21 days of storage. *Transfusion* 2017; 57 (5): 1218–25.
28. Allain J.P., Owusu-Ofori A.K., Assennato S.M., Marschner S., Goodrich R.P., Owusu-Ofori S. Effect of Plasmodium inactivation in whole blood on the incidence of blood transfusion-transmitted malaria in endemic regions: the African Investigation of the Mirasol System (AIMS) randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387 (10029): 1753–61.
29. Shcherbachenko I., Lisovskaya I., Tikhonov V. Oxidation-induced calcium-dependent dehydration of normal human red blood cells. *Free Radical Res* 2007; 41 (5): 536–45.
30. Hans A., Adenosine-5'-triphosphate: determination with phosphoglycerate kinase. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Printing, Revised), edited by Hans-Ulrich Bergmeyer H-U., Academic Press, 1965, pp. 539–58.
31. Pradedova E.V., Nimaeva O.D., Putilina T.E., Semenova N.V., Sobenin A.M., Salyaev R.K. Determination of glutathione and its redox status in isolated vacuoles of red beetroot cells. *J Stress Physiol Biochem* 2016; 12 (1): 87–107.
32. Hess J.R. Red cell storage. *J Proteomics* 2010; 73 (3): 368–73.
33. Ruddell J.P., Babcock J.G., Lippert L.E., Hess J.R. Effect of 24 hours of storage at 25°C on the in vitro storage characteristics of CPDA-1 packed red blood cells. *Transfusion* 1998; 38 (5): 424–8.
34. Hall T.L., Barnes A., Miller J.R., Bethencourt D.M., Nestor L. Neonatal mortality following transfusion of red cells with high plasma potassium levels. *Transfusion* 1993; 33 (7): 606–9.
35. Dumaswala U.J., Wilson M.J., Wu Y.L., Wykle J., Zhuo L., Douglass L.M., et al. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free Radical Res* 2000; 33 (5): 517–29.
36. Mustafa I., Marwani A., Mamdouh N.K., Abdulla K.N., Hadwan T. Time dependent assessment of morphological changes: leukodepleted packed red blood cells stored in SAGM. *Biomed Res Int* 2016; 45: 294–34.
37. Silliman C.C. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med* 2006; 34 (suppl 5): s124–31.
38. Lang E., Qadri S.M., Lang F. Killing me softly – suicidal erythrocyte death. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44 (8): 1236–43.
39. Lang F., Qadri S.M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif* 2012; 33 (1–3): 125–30.
40. Lu C., Shi J., Yu H., Hou J., Zhou J. Procoagulant activity of long-term stored red blood cells due to phosphatidylserine exposure. *Transfus Med* 2011; 21 (3): 150–7.
41. Hod E.A., Spitalnik S.L. Harmful effects of transfusion of older stored red blood cells: iron and inflammation. *Transfusion* 2011; 51 (4): 881–5.
42. Hoehn R.S., Jernigan P.L., Japtok L., Chang A.L., Midura E.F., Caldwell C.C., et al. Acid sphingomyelinase inhibition in stored erythrocytes reduces transfusion associated lung inflammation. *Ann Surg* 2017; 265 (1): 218–26.
43. Antonelou M.H., Kriebardis A.G., Papassideri I.S. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfus* 2010; 8 (suppl 13): s39–47.
44. Gilson C.R., Kraus T.S., Hod E.A., Hendrickson J.E., Spitalnik S.L., Christopher D., Hillyer C.D., et al. A novel mouse model of red blood cell storage and posttransfusion in vivo survival. *Transfusion* 2009; 49 (8): 1546–53.
45. Qadri S.M., Chen D., Schubert P., Perruzza D.L., Bhakta V., Devine D.V., et al. Pathogen inactivation by riboflavin and ultraviolet light illumination accelerates the red blood cell storage lesion and promotes eryptosis. *Transfusion* 2017; 57 (3): 661–73.
46. Harmening D. *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. 4th. edition, Philadelphia, Pa, USA: F. A. Davis Company; 2002. Laboratory methods; p. 576.
47. Greer J., Arber D. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13th edition, Philadelphia, Pa, USA: Wolters Kluwer Health; 2013. Examination of the blood and bone marrow; p. 4.
48. Relevy H., Koshkaryev A., Manny N., Yedgar S., Barshtein G. Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion* 2008; 48 (1): 136–46.
49. Schubert P., Culibrk B., Karwal S., Serrano K., Levin E., Bu D., et al. Whole blood treated with riboflavin and ultraviolet light: quality assessment of all blood components produced by the buffy coat method. *Transfusion* 2015; 55 (4): 815–23.
50. Herzig M., Fedyk C.G., Rodriguez A., Montgomery R., Kamucheka R.M., Pidcock H., et al. Blood component separation of pathogen-reduced whole blood by the PRP method produces acceptable red cells, but platelet yields and function are diminished. *Transfusion* 2016; 56 (suppl 4): 78A.
51. Custer B., Agapova M., Martinez R.H. The cost-effectiveness of pathogen reduction technology as assessed using a multiple risk reduction model. *Transfusion* 2010; 50 (11): 2461–73.
52. Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии (утвержден постановлением Правительства РФ от 26 января 2010 г. № 9).
53. Zubair A.C. Clinical impact of blood storage lesions. *Am J Hematol* 2010; 85 (2): 117–22.