

Сравнительная характеристика способности лимфоцитов к пролиферации и их жизнеспособность в цельной донорской крови, обработанной гамма-излучением и методом патогенредукции с применением рибофлавина и ультрафиолета

Я.М. Байязнова, Н.Н. Старостин, И.Б. Кумукова, Е.Ю. Осипова, П.Е. Трахтман

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

Контактная информация:
Байязнова Яна Маратовна, сотрудник лаборатории физиологии и патологии стволовых клеток НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570 (доб. 5625)
E-mail: kana-reyka@yandex.ru

Трансфузия лейкоцитов в составе различных компонентов крови – причина ряда посттрансфузионных реакций и осложнений, в том числе посттрансфузионной реакции «трансплантат против хозяина» (пТРПХ). Единственный эффективный метод профилактики пТРПХ – облучение компонентов крови ионизирующим излучением, но использование его источников связано с техническими и материальными трудностями. Альтернативой этого метода стала новая технология редукции патогенов (ТРП) в компонентах крови, их мишень – нуклеиновые кислоты. Эффективная инактивация лейкоцитов продемонстрирована в тромбоцитных концентратах и плазме крови. Определено влияние ТРП, основанной на сочетании действия рибофлавина (РФ) и ультрафиолета (УФ), на жизнеспособность и пролиферирующий потенциал лимфоцитов в обработанной цельной крови. Образцы цельной крови в объеме 450 ± 50 мл были получены у 35 здоровых добровольцев; каждый образец делили на три неравные части: одна часть – необработанный контроль, вторую часть подвергали гамма-облучению, третью часть – редукции патогенов под воздействием РФ и УФ (*Mirasol, Terumo BCT Inc.*). Отбор проб проводили в день заготовки (день 0), далее – с интервалом в 24 ч в течение трех последующих суток. Жизнеспособность лимфоцитов после применения обоих методов обработки достоверно снижалась по сравнению с контролем и на протяжении всего периода хранения по сравнению с показателями, полученными в день 0. Достоверных различий жизнеспособности между обработанными группами не обнаружено. Спонтанная пролиферативная активность необработанных и гамма-облученных лимфоцитов статистически значимо не отличалась, однако стимулированная пролиферация в гамма-облученных образцах была достоверно ниже. В образцах, обработанных РФ и УФ, как спонтанная, так и стимулированная пролиферация были снижены до порога обнаружения. В одной из процедур получены два эффекта: инфекционная и иммунологическая безопасность. Применение ТРП на цельной крови дает потенциальную возможность получения трех патоген-редуцированных и иммунологически безопасных компонентов крови, что снижает стоимость и техническую нагрузку на персонал. Использование системы РФ и УФ, в отличие от применения источников ионизирующего излучения, не имеет сложных требований безопасности и трудностей в обслуживании. По нашим данным, при использовании ТРП РФ и УФ на цельной крови, как и при гамма-облучении, жизнеспособность лимфоцитов значительно снижается, особенно в процессе хранения, но при этом обработка РФ и УФ, в отличие от гамма-облучения, полностью подавляет любую пролиферативную активность лимфоцитов. Полученные результаты демонстрируют потенциал для использования данной технологии как альтернативы облучению.

Ключевые слова: рибофлавин, ультрафиолет, гамма-облучение, лимфоциты, пролиферация, жизнеспособность

Байязнова Я.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2018; 17 (3): 66–73.
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-66-73

Proliferation and viability of whole blood lymphocytes after gamma-irradiation or pathogen reduction with riboflavin and ultraviolet

Y.M. Bayzanova, N.N. Starostin, I.B. Kumukova, E.Yu. Osipova, P.E. Trakhtman

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

Transfusion of white blood cells (WBC) with various blood components causes a number of transfusion reactions and complications. One of these is the transfusion-associated graft versus host disease (taGVHD), which still does not have effective treatment and is a fatal complication of transfusions. The only effective method of preventing taGVHD is irradiation of blood components with ionizing radiation (X-ray or gamma radiation). But the use of ionizing radiation sources has a number of technical and material difficulties. The emergence of pathogen reduction technologies (PRT) in blood components targeted by nucleic acids has opened the possibility of using these technologies as an alternative to irradiating of blood components. Several PRT demonstrated effective inactivation of WBC in platelet concentrates and blood plasma. Determination of the influence of PRT based on the combined effect of riboflavin (RF) and ultraviolet (UV) on the viability and proliferating potential of lymphocytes in processed whole blood. Comparison of these data with those obtained from gamma-irradiated and untreated (control) whole blood. Samples of whole blood were obtained in 35 healthy volunteers, in a volume of 450 ± 50 ml. Each sample was divided into three unequal parts: one part-untreated control, the second part was to gamma irradiation, the third part was treated by RF and UV PRT. (Mirasol, Terumo BCT Inc.). Sampling was conducted on the day of harvesting (day 0) and at intervals of 24 hours for 3 consecutive days. The viability of lymphocytes after application of both methods of treatment was significantly decreased in comparison with the control and throughout the storage period, compared to the values obtained on day 0. In this case, there were no significant differences in viability between the treated groups. The spontaneous proliferative activity of untreated and gamma irradiated lymphocytes did not differ statistically significantly, however, stimulated proliferation in gamma-irradiated samples was significantly lower. In samples treated with RF and UV, both spontaneous and stimulated proliferation were reduced to the detection threshold. Inactivation of WBC using modern PRT has become a pleasant and very necessary bonus for a number of reasons. So in one procedure, two effects are achieved: infectious and immunological safety. The use of PRT on whole blood gives the potential for obtaining three pathogen-reduced and immunological safety components of blood, which reduces the material cost and technical load on the personnel. Important is the fact that the use of the RF and UV system does not have such complex security requirements and difficulties in servicing as the use of sources of ionizing radiation. According to our data, the use of this TRP on whole blood, as well as gamma irradiation, significantly reduces the viability of lymphocytes, which is more pronounced during storage. But the treatment of RF and UV, in contrast to gamma irradiation completely suppresses any proliferative activity of lymphocytes. The results demonstrate a promising potential for using this technology as an alternative to irradiation.

Key words: *riboflavin, ultraviolet, gamma-irradiation, lymphocytes, proliferation, viability*

Bayzanova Y.M., et al. *Pediatric hematology/oncology and immunopathology*, 2018; 17 (3): 66–73.
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-66-73

© 2018 by NMRC PHOI

Correspondence:

Yna M. Bayzanova, research associate, Laboratory of stem cells pathology and physiology, 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
E-mail: kana-reyka@yandex.ru

Гемотрансфузия – одна из самых часто проводимых процедур, однако, несмотря на огромный накопленный опыт, в этой области существует множество нерешенных проблем. Актуальная проблема, с которой сталкиваются врачи при гемотрансфузиях, – это остаточные лейкоциты в компонентах крови, которые становятся причиной различных реакции и осложнений: фебрильной негемолитической реакции, аллоиммунизации, посттрансфузионной реакции «трансплантат против хозяина» (пТРТПХ). Эти осложнения связаны с присутствием в компонентах донорской крови (КК) жизнеспособных аллогенных популяций лейкоцитов и продуктов их метаболизма. При длительном хранении КК из остаточных лейкоцитов выделяются провоспалительные цитокины – ИЛ-1 α , ИЛ-6, ИЛ-8 и TNF α , ответственные за развитие фебрильных осложнений [1, 2]. Остаточные лейкоциты способствуют формированию иммунных ответов, обуславливающих появление резистентности к трансфузиям, передачу внутриклеточных вирусных инфекций (цитомегаловируса и др.), а также развитие пТРТПХ. Установленная законодательством разных стран норма определяет содержание резидуальных лейкоцитов – $1-5 \times 10^6$ клеток на дозу КК [3].

Существует несколько способов профилактики посттрансфузионных осложнений, связанных с

примесями лейкоцитов. Лейкоредукция, или лейкодеплеция, – это удаление значительной части лейкоцитов, обычно присутствующих в продуктах крови, с помощью лейкоцитарных фильтров. Различают два метода решения этой проблемы: лейкоредукция в процессе заготовки либо непосредственно перед трансфузией у постели пациента [4]. Но лейкофльтрация не приводит к полному предотвращению этих реакций. Во многих странах Европы, в Австралии, Японии и Канаде лейкоредукцию проводят в обязательном порядке [5], в других странах применяют избирательно – для поддержки определенных категорий пациентов, преимущественно больных со злокачественными образованиями с нарушениями функции иммунной системы, а также для новорожденных.

При обработке компонентов крови рентгеновским либо гамма-облучением в дозе 15–25 Гр инактивация лейкоцитов осуществляется за счет прямого повреждающего влияния ионизирующего излучения на ДНК, а также в результате действия на нее образовавшихся ионов и свободных радикалов. В России принята доза ионизирующего облучения компонентов крови, равная 25 Гр. Несмотря на широкую распространенность, данный метод не лишен недостатков: риск радиоактивного загрязнения установки и окружающей среды в случае аварийных ситуаций

или разгерметизации источников; необходимость дозарядки источников по мере распада радиоизотопов; необходимость специальной утилизации установки с радиоизотопными источниками, что значительно усложняет процедуру. Тем не менее данный метод рекомендован мировым стандартом для профилактики развития птРТПХ у пациентов с заболеваниями иммунной системы [1].

Внедрение в трансфузиологическую практику методов редукции патогенов позволило не только снизить вероятность передачи гемотрансмиссивных инфекций: фотохимическое воздействие также оказывает значительное влияние на ядросодержащие клеточные компоненты, в том числе остаточные лейкоциты. Все применяемые в настоящее время методы редукции патогенов основаны на использовании ультрафиолетового (УФ) излучения, обычно в сочетании с фотосенсибилизирующим агентом, и направлены на нуклеиновые кислоты патогенов и лейкоцитов. Фотосенсибилизаторы, поглощая энергию света, переходят в возбужденное состояние, а затем могут вступать в химические реакции двух типов. В реакциях 1-го типа первичной стадией служит перенос электрона с возбужденной молекулы фотосенсибилизатора на субстрат окисления (в данном случае ДНК/РНК), что приводит к их повреждению. В реакциях 2-го типа возбужденные молекулы фотосенсибилизаторов взаимодействуют с кислородом с образованием высокоактивного синглетного кислорода, который также может вступать в реакцию с ДНК/РНК [6–8]. Ряд исследований продемонстрировал, что методы редукции патогенов могут служить альтернативой ионизирующему облучению для профилактики развития птРТПХ [9, 10]. Однако до недавнего времени все методы фотообработки крови УФ имели одно общее ограничение – интенсивное рассеивание делало невозможным обработку компонентов с уровнем гематокрита более 4%.

Разработка методики редукции патогенов в цельной крови с использованием УФ и рибофлавина (РФ) позволила эффективно воздействовать на широкий спектр инфекций, передающихся с компонентами крови: бактерии, вирусы, простейшие микроорганизмы. Однако воздействие данной методики на остаточные лейкоциты пока не изучено.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования служили 35 образцов цельной крови, полученных от здоровых доноров-добровольцев, письменно подтвердивших свое желание участвовать в проводимых экспериментах.

Сбор донорской крови в объеме 450 мл \pm 10% проводили с использованием пластиковых вакуумных контейнеров IMUFLEX-WB-RP *Terumo* ВСТ со-

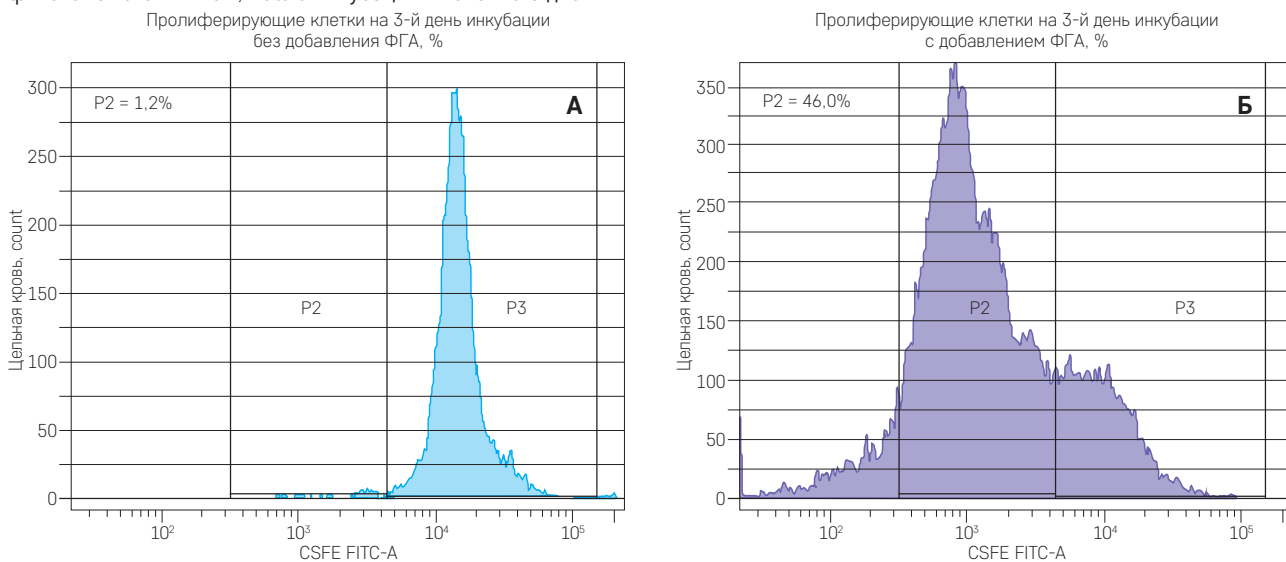
гласно инструкции производителя; в качестве антикоагулянта использовали цитратный раствор (CPD-1, цитрат-фосфат-глюкоза), лейкофильтрацию после сбора не проводили. Цельная кровь хранилась в течение 2 ч с момента заготовки при температуре +20–24 °С. После перемешивания образцы крови аликвотировали. Отбор проб проводили в стерильных условиях с использованием устройства для стерильного запаивания трубок пластиковых гемоконтейнеров TSCD-II (*Terumo*, США) и пробоотборников. Проводили отбор двух проб по 8–10 мл: одна проба – контрольная, вторую подвергали гамма-облучению. Гамма-облучение проводили в день заготовки КК на облучателе *GammaCell-3000* (*BestTheratronics*, Канада). Суммарная поглощенная доза облучения составляла 25 Гр.

Инактивацию опытных образцов цельной крови проводили по технологии *MirasolPRT* (*CaridianBCT*, США) – это фотохимическая инактивация патогенов и аллогенных лейкоцитов в цельной крови и ее компонентов, основанная на сочетанном использовании РФ и УФ-облучения (РФ + УФ). Образец цельной крови переносили в пакет для облучения системы *Mirasol*. В цельную кровь добавляли рибофлавин системы *Mirasol* объемом 35 мл в концентрации 500 мкмоль/л. Проводили стандартную процедуру облучения эритроцитов ультрафиолетом в дозе 80 Дж/мл. После процедуры обработки эритроцитов УФ + РФ отбирали опытный образец. Выделение мононуклеаров на *LymphocytesSeparationMedia*, *Capricorn* происходило по стандартной методике, после этого клетки метили флюоресцентным красителем CFSE, который взаимодействует с ацетильными группами в клетке, за счет чего закрепляется в ней. Не связавшийся CFSE вымывается из клеток в течение суток, что приводит к небольшому уменьшению интенсивности свечения. По мере деления клетки краситель равномерно распределяется между дочерними клетками. После анализа клеток на проточном цитофлуориметре получен график зависимости интенсивности свечения от количества событий: наблюдается образование области с уменьшенной интенсивностью свечения, где располагаются клетки, входившие в цикл. Краситель обладает также низкой токсичностью при длительном культивировании, что очень важно, учитывая время инкубации в данном эксперименте.

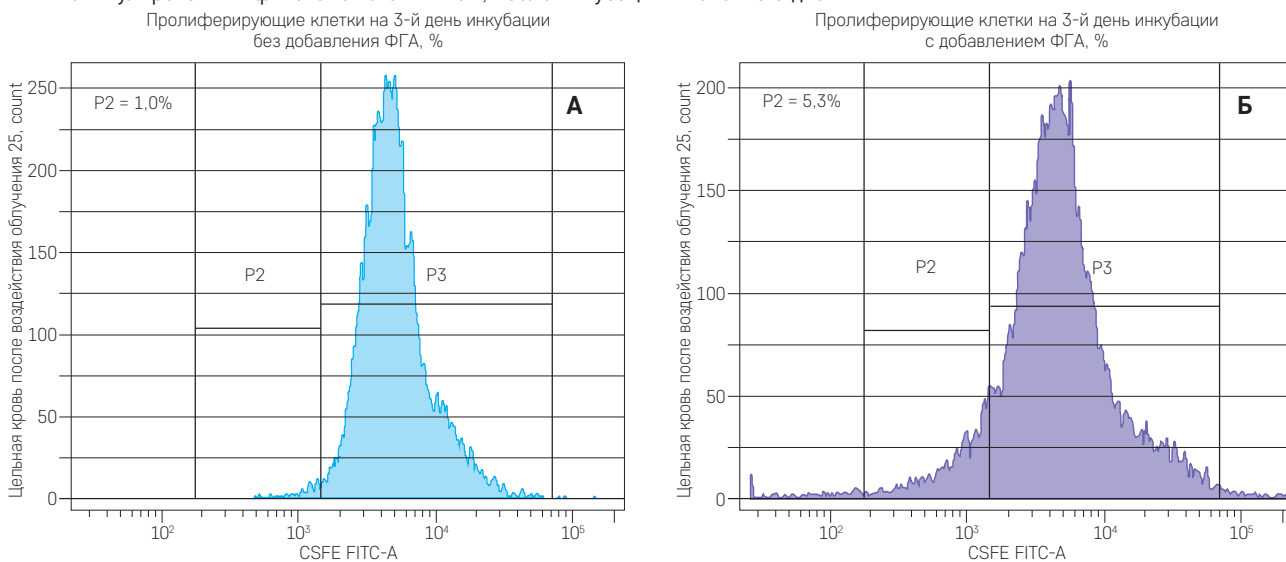
По методике 1×10^7 клеток (необработанные, после воздействия гамма-облучения, после воздействия УФ + РФ) обрабатывали CFSE в 1 мл среды RPMI, *Capricorn*, 5 мин, при комнатной температуре, в темноте; количество красителя – 0,5 мкл. После этого клетки отмывали 2 раза PBS с 10% FBS. В 96-луночный планшет вносили 100 мкл меченых мононуклеаров в концентрации 5×10^4 клеток/луно-

Рисунок 1

Процент пролиферирующих лимфоцитов (медиана), выделенных из цельной крови, не стимулированных и стимулированных фитогемагглютинином, после инкубации в течение 3 дней

**Рисунок 2**

Процент пролиферирующих лимфоцитов (медиана), выделенных из цельной крови после гамма-облучения, не стимулированных и стимулированных фитогемагглютинином, после инкубации в течение 3 дней

**Рисунок 3**

Процент пролиферирующих лимфоцитов (медиана), выделенных из цельной крови, обработанной рибофлавином и ультрафиолетом, не стимулированных и стимулированных фитогемагглютинином, после инкубации в течение 3 дней

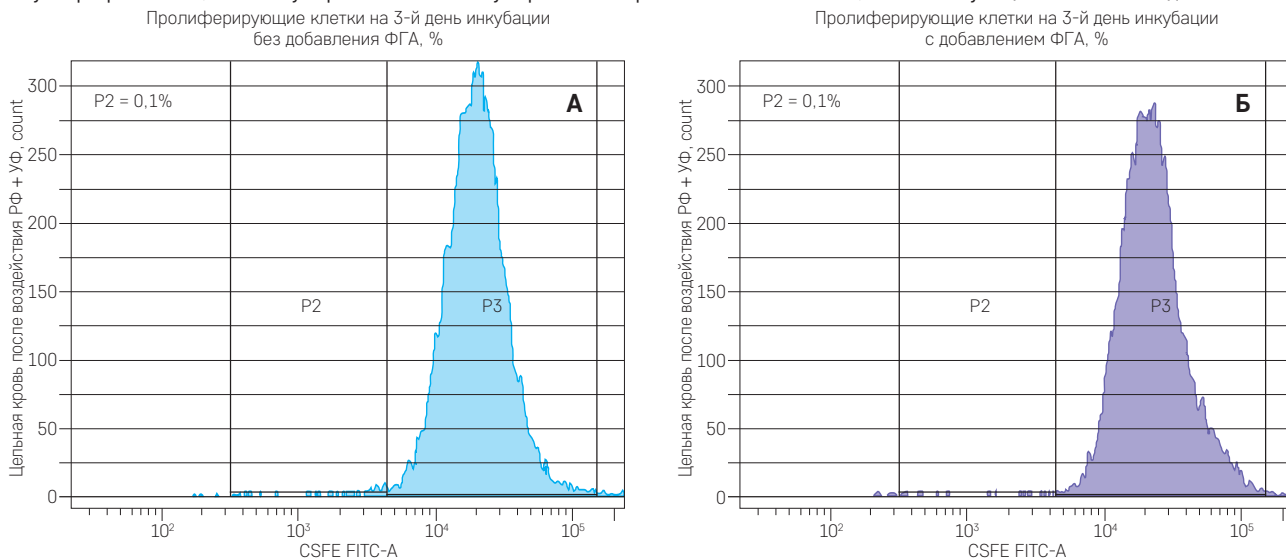
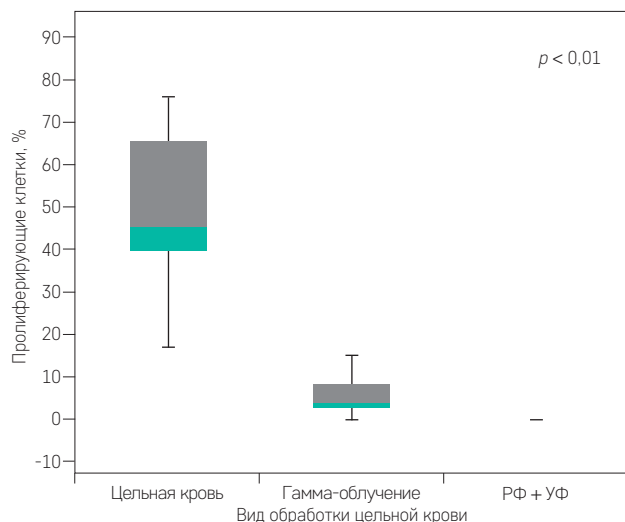


Рисунок 4

Процент пролиферирующих лейкоцитов в зависимости от способа обработки цельной крови (медиана \pm стандартное отклонение)



ка с добавлением 100 мкл RPMI (отрицательный контроль) либо 100 мкл ФГА. Конечная концентрация ФГА – 10 мкг/мл. Все разведения проводили в среде RPMI, *Capricorn* с добавлением 10% FBS; каждый образец ставили в двух повторах. Цельная кровь служила положительным контролем всего эксперимента.

Инкубация длилась три дня; перед анализом к каждому образцу добавляли 7-AAD (*7-Aminoactinomycin D*), *ThermoFisherScientific*, для определения процента жизнеспособных клеток. У клеток, подвергшихся апоптозу, нарушается целостность мембраны, благодаря чему краситель проникает внутрь и взаимодействует с участками, богатыми GC-парами. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BDFACSCantoll (*BecktonDickens*, США) с использованием программного обеспечения *Diva*.

Статистическую обработку проводили с использованием программы XLStat 7.0. Все данные представлены в виде медианных значений; оценка достоверности проведена с использованием непараметрических методов (метод Краскела–Уоллиса), уровень достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После инкубации клетки анализировали на проточном цитофлуориметре; результаты оценивали

Таблица

Количество жизнеспособных клеток на 0, 1, 2 и 3-й дни после обработки ионизирующим излучением либо ультрафиолетом в присутствии рибофлавина

| | Жизнеспособные клетки (медиана), % | | | |
|--------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|
| | день 0 | 1-й день | 2-й день | 3-й день |
| Цельная кровь (контроль) | 95,6 | 94,0 | 86,5 | 84,1 |
| УФ + РФ | 80,0 | 77,5 | 65,6 | 63,0 |
| Гамма-облучение (25 Гр) | 84,5 | 83,0 | 72,0 | 69,0 |

по графикам зависимости интенсивности свечения CFSE от количества зарегистрированных событий. Цельная кровь выступала в качестве положительного контроля пролиферации активированных клеток. В гейте P2, где должны быть пролиферирующие клетки, располагается 1,2% клеток, которые могут быть единичными, спонтанно пролиферирующими (рисунок 1 А). После стимуляции ФГА в гейте P2 располагается 46,0% клеток, видны четкие пики деления клеток (рисунок 1 Б).

В 35 исследуемых образцах цельной крови, подвергнутых гамма-облучению в дозе 25 Гр, не отмечено достоверного снижения спонтанной пролиферативной активности лимфоцитов (в гейте P2 – 1,0% клеток), при этом пролиферативная активность лимфоцитов после стимуляции ФГА достоверно снижалась до 5,3% клеток ($p < 0,001$) (рисунки 2 А, Б). Напротив, во всех исследованных образцах цельной крови после процедуры патоген-инактивации с применением РФ и УФ отмечено значительное снижение спонтанной и активированной ФГА пролиферативной активности лимфоцитов до общего значения 0,1% общего числа выделенных клеток (гейт P2 на рисунках 3 А, Б).

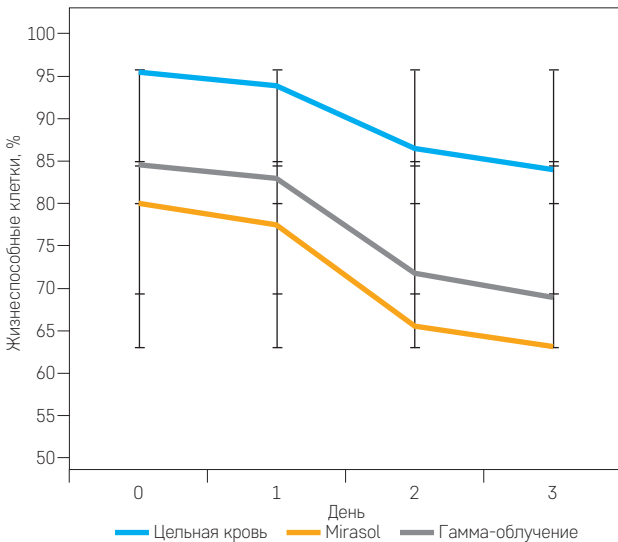
Таким образом, выявлено достоверное ($p < 0,01$ для всех групп сравнения) снижение пролиферативной активности лимфоцитов (спонтанной и ФГА-индуцированной), выделенных из цельной донорской крови при использовании технологии патоген-инактивации с применением РФ и УФ, по сравнению со стандартным гамма-облучением в дозе 25 Гр (рисунок 4).

Жизнеспособность лейкоцитов определяли путем культивирования в бессывороточной среде RPMI в отсутствие любых стимуляторов на 0, 1, 2 и 3-й дни. Клетки метили 7-AAD, после этого проводили анализ на проточном цитофлуориметре. Как видно из таблицы, на день 0 (день постановки эксперимента) жизнеспособность сохраняют более 80% лимфоцитов во всех группах сравнения, при этом отмечено достоверное снижение количества жизнеспособных клеток в компонентах, подвергнутых обработке гамма-облучением ($p < 0,05$) либо УФ-облучением в присутствии РФ ($p < 0,05$). Статистически достоверных различий между группами в зависимости от использованного метода обработки не выявлено. Количество жизнеспособных клеток постепенно снижается

к 3-му дню наблюдения, когда эксперимент завершился, но тем не менее составляет более 60% для всех групп сравнения. Отмечена достоверная тенденция к ускорению гибели клеток при воздействии облучением (гамма-облучением либо УФ + РФ) по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для обеих групп), при этом статистически достоверных различий между группами гамма-облучения и УФ + РФ не выявлено (рисунок 5).

Рисунок 5

Жизнеспособность клеток, подвергнутых гамма-облучению и облучению ультрафиолетом в присутствии рибофлавина



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Профилактика посттрансфузионных осложнений и передача гемотрансмиссивных инфекций – актуальные проблемы трансфузиологии. Примеси резидуальных лейкоцитов являются медиаторами развития значительного числа реакций и осложнений, а также потенциальным резервуаром для внутриклеточных патогенов (в первую очередь вирусов герпес-группы). Внедрение методов лейкофилтрации позволяет снизить содержание остаточных лейкоцитов в КК на два порядка, однако не способно полностью предотвратить развитие посттрансфузионных реакций вплоть до жизнеугрожающих, включая пТРТПХ [2, 11]. Обработка КК ионизирующим излучением – высокоэффективный способ инактивации лимфоцитов и профилактики пТРТПХ, однако он приводит к значительному повреждению клеток крови, что снижает эффективность трансфузий. Кроме того, ионизирующее излучение в дозах 20–30 Гр не оказывает воздействия на потенциально присутствующие в КК патогены.

Существует общепринятый стандартный комплекс мероприятий по профилактике заражения гемотрансмиссивными инфекциями: совершенство-

вание методов отбора доноров, технология двухэтапного лабораторного скрининга (серологический скрининг + тестирование нуклеиновых кислот – NAT), бактериальное тестирование, архивация донорских образцов, выполнение программы по карантинизации плазмы. Однако серологические методы и NAT снижают, но не исключают вероятность передачи стандартных тестируемых патогенов [12], так как у скрининг-тестирования есть недостатки: период серонегативного окна и ограниченная чувствительности тест-систем, отсутствие скрининговых тест-систем для новых патогенов и мутации уже тестируемых. В связи с улучшением транспортной доступности между странами и увеличением количества путешественников вирусы и бактерии беспрепятственно распространяются на новые территории [13, 14]. Учитывая, что на сегодняшний день доноров диагностируют на ВИЧ, сифилис, гепатиты В и С и в редких случаях на другие вирусы, проблема передачи неэндемичных для данных регионов патогенов стоит очень остро. В 2009 году Комитет по заболеваниям, передаваемым при переливании крови, определил 68 новых патогенов с подтвержденным или потенциальным риском передачи при переливании КК. Как приоритетные были определены следующие патогены: вирус лихорадки Денге и *Babesia spp.*, вирус Чикунгуньи, *Leishmania spp.*, *Plasmodia spp.*, *Trypanosoma cruzi*, парвовирус В19, аденовирус человека 5-го типа, вирус гриппа H1N1 [15]. Учитывая это, намного целесообразнее внедрять различные технологии инактивации патогенов (ИП) и донорских лейкоцитов в КК. Современные технологии ИП позволяют в короткие сроки получать КК, свободными от патогенов, тем самым обезопасив реципиента от возможных трансфузионных осложнений [16]. Технологии ИП особенно актуальны для регионов с высоким уровнем распространенности инфекций, вызываемых постоянно мутирующими формами патогенов. Технологии ИП также позволяют эффективно инактивировать остаточные донорские лейкоциты, что очень важно для иммунокомпроментированных лиц.

Мы провели оценку воздействия технологии редукции патогенов с применением УФ и РФ на лейкоциты, содержащиеся в цельной крови доноров, в сравнении с необработанной кровью (позитивный контроль) и кровью, подвергнутой гамма-облучению (негативный контроль). Исследуемая технология использует УФ-свет ближнего и среднего диапазонов (265–370 нм) и РФ в качестве фотосенсибилизирующего агента. После активации УФ-светом РФ окисляет остатки гуанина в ДНК и РНК с помощью прямых реакций электронного переноса [17]. Рибофлавин-индуцированные повреждения необратимы, поскольку сильно тормозят процесс репликации и репарации РНК/ДНК. Частота повреждений нуклеи-

новых кислот составляет приблизительно 1 на 350 пар оснований [18].

Помимо прямого действия активированного РФ на нуклеиновые кислоты, УФ может выступать отдельным фактором, оказывающим дополнительное разрушающее действие. Так, было показано, что лейкоциты, обработанные РФ + УФ, теряют свою иммуногенность – происходит уменьшение либо прекращение экспрессии HLA-DR, CD80, CD86, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 и LFA-3. В сочетании с нарушением структуры белков это может затруднять перемещение рецепторов и образование контактов с другими клетками для стабилизации взаимодействий [19]. Механизмы, регулирующие поверхностную экспрессию молекул адгезии после воздействия УФ-излучения, еще не идентифицированы, но возможные объяснения выходят за пределы повреждения ДНК. Было показано, что воздействие УФ-излучения изменяет мембранный потенциал, способствует продукции активных форм кислорода, полимеризует липиды в билипидных слоях [20] и инициирует сигнальные каскады, начиная с активации тирозинкиназ Src, включая H-Ras и Raf-1, и приводит к активации NF- κ B и AP-1. Было обнаружено, что наблюдаемая активация NF- κ B и AP-1 не зависит от повреждения ДНК, но зависит от клеточной мембраны [21].

Поскольку РФ присутствует в организме и не является токсичным, то его не нужно удалять после инактивации, что способствует упрощению и удобству всей процедуры. Оценка токсичности РФ и его фотопродуктов была выполнена на моделях *in vitro*, *in vivo*; ни в одном из выполненных исследований токсикологически значимых данных не было обнаружено [22].

Проведено сравнение способности к спонтанной и индуцированной пролиферации в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином (ФГА). В отличие от лейкоцитов из контрольной группы, не подвергавшихся обработке, лейкоциты, обработанные УФ + РФ, не были способны пролиферировать: как спонтанная, так и ФГА-индуцированная пролиферативная активность не превышала 0,1% общего числа исследованных клеток, что соответствует значениям фонового сигнала при проведении цитометрических исследований. Полученные результаты согласуются с результатами *in vivo*: в исследовании *Fast* и др. показано, что у животных, которым была проведена трансфузия лейкоцитов, обработанных УФ + РФ, не развивалась пТРТПХ, о чем свидетельствовало отсутствие характерных для этой реакции симптомов, не происходила выработка антител, не повышался уровень цитокинов [9], отмечена также неспособность этих клеток стимулировать пролиферацию лейкоцитов реципиента [10].

Несмотря на то что обработка гамма-облучением в дозе 25 Гр приводила к достоверному снижению

спонтанной и ФГА-индуцированной пролиферативной активности лимфоцитов по сравнению с позитивным контролем, значимо большее число клеток сохраняло эту способность (1,0 и 5,3%, соответственно; $p < 0,05$). Ионизирующее излучение уменьшает, но не устраняет полностью иммунологические последствия, опосредованные небольшим количеством лейкоцитов, сохранивших способность к пролиферации, выработке цитокинов и аллостимуляции лейкоцитов реципиента [2, 11]. В исследовании *L.D. Fast, et al.* проведено количественное сравнение продукции цитокинов в КК на фоне стимуляции липополисахаридом или анти-CD3/CD28 [10]. В клетках, подвергнутых облучению УФ + РФ, уровень всех цитокинов был ниже порога обнаружения (за исключением IL-8), в отличие от клеток, обработанных гамма-облучением.

Оба метода обработки цельной крови приводили к достоверному снижению жизнеспособности остаточных лейкоцитов. Результаты оценки пролиферативной активности позволяют предположить, что большинство жизнеспособных лейкоцитов находится в стадии апоптоза, индуцированного воздействием гамма-облучения или УФ + РФ. Несмотря на то что различия между исследуемой группой и негативным контролем не достигали статистической достоверности на всем протяжении эксперимента, выявление тренда к ускоренной гибели ядродержащих клеток после облучения УФ + РФ свидетельствует о преимуществе данного метода обработки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что применение метода редукции патогенов с использованием УФ и РФ к эритроцитсодержащим компонентам крови эффективно и может служить альтернативой обработке крови ионизирующим излучением.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Bayzanova Y.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5698-0106>

Starostin N.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1219-8654>

Kumukova I.B. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9881-1041>

Osipova E.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1873-3486>

Trakhtman P.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0231-1617>

Литература

1. Seftel M.D., Grove G.H., Petraszko T., Benny W.B., Le A., Lee C.Y., et. al. Universal prestorageleukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood* 2004; 103 (1): 333–9.
2. Hendrickson J.E., Hillyer C.D. Noninfectious serious hazards of transfusion. *Anesthesiology Analgesic* 2009; 108 (3): 759–69.
3. Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Strasbourg, France: Council of Europe Press, 2010.
4. Price T.H. Provision of single-donor platelet transfusions: patient and producer perspectives. *Apheresis: Principles and Practice*, second edition. Bethesda: AABB Press, 2003.
5. Гордеев А.В. Актуальное состояние методических и технических решений радиационной обработки крови, ее компонентов и препаратов. *Саратовский научно-медицинский журнал* 2014; 10 (4).
6. Жибурт Е.Б. Инактивация патогенов в клеточных компонентах крови. *Трансфузиология* 2017; 18 (3).
7. Castro G., Merkel P.A., Giclas H.E., Gibula A., Andersen G.E., Corash L.M., et. al. Amotosalen/UVA treatment inactivates T-cells more effectively than the recommended gamma dose for prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfusion* 2018; 58 (6): 1506–15.
8. Marschner S. White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion* 2010; 50: 2489–98.
9. Fast L.D. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. *Transfusion* 2010; 51 (7): 1397–404.
10. Jackman R.P., Heitman J.W., Marschner S., Goodrich R.P., Norris P.J., et. al. Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity after pathogen reduction: mechanisms of action in ultraviolet illumination and riboflavin treatment. *Transfusion* 2009; 49 (12): 2686–99.
11. Fast L.D., DiLeone G., Li J., Goodrich R. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 2006; 46 (4): 642–8.
12. Schmidt M. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion* 2009; 49 (9): 1836–44.
13. Sharma S.P. Dengue outbreak affects more than 7000 people in Nepal. *BMJ* 2010; 41: 5496–6.
14. Rasonglès P., Angelini-Tibert M.F., Simon P., Currie C., Isola H., Kientz D. Transfusion of platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment during a Chikungunya virus epidemic in Ile de La Réunion. *Transfusion* 2009; 49: 1083–91.
15. Stramer S.L., Hollinger F.B., Katz L.M., Kleinman S., Metzel P.S., Gregory K.R. et. al. Emerging infectious disease agents and the potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009; 49 (2): 1S–29S.
16. Elikaei A., Hosseini S.M., Sharifi Z. Inactivation of model viruses and bacteria in human fresh frozen plasma using riboflavin and long wave ultraviolet rays. *Iranian Journal of Microbiology* 2017; 9 (1): 50–4.
17. Marschner S., Goodrich R. Pathogen reduction technology treatment of platelets, plasma and whole blood using riboflavin and UV light. *Transfusion Medicine* 2011; 38: 8–18.
18. Kleinman S., Stassinopoulos A. Risks associated with red blood cell transfusions: potential benefits from application of pathogen inactivation. *Transfusion* 2015; 55: 2983–3000.
19. Jackman R.P. Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity after pathogen reduction: mechanisms of action in ultraviolet illumination and riboflavin treatment. *Transfusion* 2009; 49: 2686–99.
20. Okazaki T., Inaba T., Tatsu Y., Tero R., Urisu T., Morigaki K. Polymerized lipid bilayers on a solid substrate: morphologies and obstruction of lateral diffusion. *Langmuir* 2009; 25: 345–51.
21. Johnson L. Treatment of platelet concentrates with the mirasol pathogen inactivation system modulates platelet oxidative stress and NF- κ B activation. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2015; 42 (3): 167–73.
22. Reddy H.L. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfusion medicine reviews* 2008; 22 (2): 133–53.