

**ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ  
ПАТОГЕНОВ В ПРЕПАРАТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

Голованова И.С., Касьянов А.Д., Волкова С.Д., Чечеткин А.В.

*Российский НИИ гематологии и трансфузиологии*

*191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16*

*Тел./факс (812) 274-56-50 / (812) 717-25-50*

*e-mail: [RNIHT@mail.ru](mailto:RNIHT@mail.ru)*

**Резюме:** Исследованы результаты применения фуллеренсодержащих фотосенсибилизаторов для инактивации вирусов в препаратах донорской плазмы. Определены оптимальные условия проведения процесса фотодинамического воздействия.

**Ключевые слова:** препараты плазмы крови, фуллерены, фотодинамическое воздействие, гемотрансмиссивные вирусы, цитотоксичность.

**FEASIBILITY OF FULLERENE C<sub>60</sub> FOR INACTIVATION OF PATHOGENS IN  
BLOOD-PLASMA PRODUCTS**

Golovanova I.S., Kasjanov A.D., Volkova S.D., Chechetkin A.V.

*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology*

**Abstract:** The use of fullerene-containing photosensitizers to inactivate viral pathogens in donor plasma products was studied. The optimal conditions to carry out photodynamic effect were defined.

**Key words:** donor plasma, fullerenes, photodynamic effect, blood transmission infections, cytotoxicity.

**Введение**

Защита компонентов крови от патогенов является одним из наиболее важных вопросов трансфузионной медицины. Несмотря на развитие лабораторных технологий остается высоким остаточный риск инфицирования реципиентов переносимыми с кровью патогенами. Нехватка донорских ресурсов и отсутствие адекватного отбора доноров в дополнение к увеличению показателя распространенности инфекции среди населения ставят под угрозу безопасность пациентов [1]. В связи с этим при производстве компонентов и препаратов крови был введен ряд новых технологий, позволяющих минимизировать риск передачи инфекционных агентов. К таким технологиям относятся физические, химические и фотохимические методы инактивации. Наибольшее

распространение получили два направления. Это, прежде всего, сольвент-детергентный метод, используемый в заводских условиях. Вторая активно развивающаяся группа методов использует фотодинамическую обработку гемокомпонентов с помощью водорастворимых красителей. Принцип фотодинамического воздействия заключается в активации светомвводимого фотосенсибилизатора, генерации активных форм кислорода (в том числе синглетного кислорода) и последующего разрушения ими инфекционных агентов [2].

Следует отметить, что перечисленные методы реализуются с использованием зарубежных технологий. В России в качестве средства профилактики передачи гемотрансмиссивных инфекций используется метод карантинизации донорской плазмы. Этот метод является затратным. При неявке донора на повторное обследование, плазма не может быть использована для клинического применения. С учетом изложенного, становится очевидной актуальность разработки отечественных методов для инактивации вирусных инфекций в плазме и ее препаратах.

Эффективность методов вирусинактивации имеет свои ограничения, которые представляют компромисс между способностью уничтожить вирус и необходимостью избежать негативного воздействия на белки плазмы и клетки крови. Методов инактивации известно достаточно много, хотя лишь некоторые из них разрешены для использования в производстве лечебных средств из плазмы крови. К тому же в настоящее время ни один из известных методов не является универсальным и пригодным для любого компонента или препарата донорской крови [3].

Установлено, что вирусы эффективно инактивируются активными формами кислорода (синглетным кислородом), которые образуются при облучении фотосенсибилизаторов. Наиболее широко используются водорастворимые красители: фталоцианины, феноцианины, производные порфиринов и другие. Однако использование данных веществ для фотодинамической инактивации белковых препаратов плазмы является нецелесообразным из-за сложности последующего отделения продуктов распада под действием облучения или самих фотосенсибилизаторов из больших объемов биологических жидкостей [4].

Продуктивным является использование в качестве фотосенсибилизатора не растворимых в воде соединений. При этом эти соединения должны эффективно производить активные формы кислорода, быть фотостабильными и легко отделяться от реакционной среды. Установлено, что таким соединением является твердофазный фотосенсибилизатор на основе фуллерена  $C_{60}$  [5, 6].

**Целью** настоящей работы являлось исследование возможностей применения метода фотодинамического воздействия с использованием композиционного твердофазного фуллеренсодержащего наноструктурного фотосенсибилизатора (ТФНФ) для инактивации вирусов в препаратах плазмы крови.

#### **Материалы и методы**

В качестве источника синглетного кислорода был использован фотосенсибилизатор, изготовленный в ОАО «ГОИ им. С.И. Вавилова» (Санкт-Петербург), 99,85% чистоты, нанесенный на силикагель марки КСК (Россия), дробленный и фракционированный (20–30 мкм). В качестве объекта исследования использовали 10% раствор альбумина человека производства ФГУП НПО «Микроген» (г. Пермь).

В качестве источника облучения использовали двустороннюю светодиодную панель на основе светодиодов Edison и матированной линзы Carclo 40°. Длина волны в максимуме излучения составляла 460 нм. Опытный макет аппаратуры для фотодинамической инактивации создан в ОАО «ГОИ им. С.И. Вавилова».

Фотоинактивацию 10% раствора альбумина, содержащего вирус, проводили в термостатируемом сосуде, куда помещали требуемое количество ТФНФ. Сосуд закрепляли на перемешивающем устройстве между двумя светодиодными матрицами. Процесс инактивации проводили в атмосфере кислорода при постоянной температуре. Скорость перемешивания обеспечивала взвешенное состояние фотосенсибилизатора. Реакционная смесь облучалась осветителем на основе двусторонней светодиодной панели. Мощность облучения составляла 80–100 мВт/см<sup>2</sup>. По завершению процесса отбирали 1 мл реакционной смеси и подвергали центрифугированию на центрифуге LMC – 4200 R (BioSan). Надосадочную жидкость исследовали на наличие вируса. Для экспериментов был использован вирус гриппа A/PR/8/34(H1N1) из коллекции вирусных штаммов ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Все эксперименты по инактивации проводили при одинаковом освещении, скорости перемешивания, режиме термостатирования. Средняя мощность освещения составляла 98-105 мВт/см<sup>2</sup> и не менялась в течение эксперимента. Температура составляла 16–19°C. Значение pH раствора инактивируемого альбумина не изменялось за время эксперимента. В качестве переменных параметров использовали количество фотосенсибилизатора и время процесса инактивации.

Для определения влияния на клетки крови раствора альбумина, подвергнутого процессу фотодинамической обработки, в отдельных экспериментах смешивали цельную донорскую кровь с небольшим количеством раствора альбумина (10:1) и проводили изучение клеточных элементов по предложенным ниже схемам. Функциональная

активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) крови доноров исследовалась с помощью теста спонтанного восстановления красителя нитросинего тетразолия (НСТ) после 30-ти минутной инкубации при +37°C 1 мл крови донора с добавлением 0,1 мл раствора альбумина [6, 7]. Результаты оценивались путем подсчета количества НСТ-позитивных НГ на 100 клеток в иммерсионной системе светового микроскопа .

Изменение морфологии эритроцитов исследовали путем подсчета процента эхиноцитов на 1000 клеток в неокрашенном мазке смеси инактивированного альбумина и крови (1: 10) при инкубации в течение 30 минут при +37°C.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ Microsoft Excel.

### Результаты и обсуждение

Рассматривали зависимость редукции вируса от количества внесенного фотосенсибилизатора. Инактивацию образцов, содержащих вирус гриппа А/PR/8/34(H1N1) в 10% растворе альбумина, проводили при длине волны 460 нм. Продолжительность освещения составляла 60 минут.

Для выработки большего количества синглетного кислорода до облучения проводили процедуру насыщения кислородом. Время насыщения кислородом 30 минут.

Выявлена зависимость между снижением титра вируса гриппа и концентрацией фотосенсибилизатора. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1– Инактивация вируса гриппа в 10% растворе альбумина в зависимости от концентрации ТФНФ

№№ опытов	Концентрация фотосенсибилизатора, %	Экспериментальная инфекционная доза, log	
		исходный титр	конечный титр
1	1	7,0	4,5
2	1	4,5	2,5
3	2,5	7,0	3,5
4	2,5	7,5	5,5
5	2,5	7,0	3,0
6	2,5	4,5	1,5
7	5	7,0	2,0
8	5	4,5	1,0
9	5	5,0	1,0
10	5	5,0	1,0
11	5	9,5	4,0

Из приведенных данных следует, что внесение 1% фотосенсибилизатора приводило к снижению титра вируса в среднем на 2,25 log ЭИД<sub>50</sub> (доза вируса, вызывающая инфицирование 50% эмбрионов). При воздействии фотосенсибилизатора в концентрации 2,5% среднее снижение титра вируса составляло 3,17 log ЭИД<sub>50</sub>. Воздействие фотосенсибилизатора в концентрации 5% приводило к снижению титра вируса на 3-5,5 log ЭИД<sub>50</sub> по отношению к исходному значению.

Проведены исследования (18 экспериментов) с целью определения наиболее оптимального времени облучения опытных образцов для инактивации вируса. Использовалась 5% конечная концентрация фотосенсибилизатора. Опыты проводили с процедурой насыщения кислородом (до облучения) в течение 30 минут при длине волны 460 нм. Время облучения варьировало от 15 до 75 минут. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Инактивация вируса гриппа в 10% растворе альбумина в зависимости от времени облучения (M±m, n=18)

Экспериментальная инфекционная					
доза, log					
исходный титр	конечный титр				
	время облучения, мин				
	15	30	45	60	75
4,81±0,5	3,81	3,1	2,38	1,50±	0,75±0,
6	±0,48	9±0,34	±0,18*	0,16**	05**

Примечание – \* p<0,05 – статистически значимое отличие по сравнению с исходным значением.

– \*\* p<0,01 – статистически значимое отличие по сравнению с исходным значением.

При анализе полученных результатов максимальное снижение титра вируса выявлено при проведении процесса фотодинамической инактивации в течение 60 и 75 минут.

В результате проведенных экспериментов (n=18) установлено, что функциональная активность НГ, оцениваемая по количеству НСТ-позитивных нейтрофилов, под воздействием раствора альбумина, подвергнутого фотодинамической обработке, значимо

не изменялась ( $p > 0,05$ ). Количество эхиноцитов в опыте имело тенденцию к увеличению ( $p > 0,05$ ). Необходимо отметить, что полученные результаты соответствуют референтным значениям (5-15% и 0-3%, соответственно) [9]. Результаты экспериментов представлены в таблице 3.

Таблица 3– Результаты исследования цитотоксичности раствора альбумина после процесса инактивации ( $M \pm m$ ,  $n=18$ )

Спонтанный НТС-тест, %		Содержание эхиноцитов, %	
контроль	опыт	контроль	опыт
8,5± 0,7	7,7± 1,1	2,2±0,2	2,8 ± 0,3

Таким образом, показано отсутствие возможности значимого токсического влияния раствора альбумина, подвергнутого фотодинамической обработке, на морфофункциональные показатели клеток крови.

### **Выводы**

В результате проведенных исследований разработана и апробирована технология вирусной фотоинактивации препаратов крови с использованием наноструктурного композитивного фотосенсибилизатора. Ее эффективность подтверждена результатами, полученными в ходе проведенных экспериментов. Установлено, что в растворе альбумина происходило снижение исходного титра вируса гриппа на 3–5,5 log ЭИД<sub>50</sub>. В нескольких экспериментах титр вируса гриппа снизился до 0 log ЭИД<sub>50</sub> по отношению к исходному значению.

По результатам экспериментов определены оптимальные условия фотодинамической инактивации вируса гриппа для 10% раствора альбумина, а именно, мощность светового потока 98-105 мВт/см<sup>2</sup>, длина волны – 460 нм, время воздействия на препараты – 60-75 минут, концентрация фотосенсибилизатора – 5%.

Дополнительным преимуществом предлагаемого процесса является отсутствие свойства цитотоксичности.

## Литература

1. Голованова И.С., Касьянов А.Д., Стародубцев А.М. и др. Изучение возможности использования фуллеренов для вирусной инактивации препаратов крови // Вестник гематологии. – 2014. – Т.Х, № 4. – С.18.
2. [Селиванов Е.А.](#), [Белоусова И.М.](#), [Иванова Р.П.](#) и др. Новые подходы к фотодинамической инактивации вирусов в плазме донорской крови с помощью фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов // Медицинский академический журнал.- 2009.-т.9, №4.-с.83-86.
3. Nemes L., Lissitchkov T., Dobaczewski A. et al. Evaluation of pharmacokinetics, efficacy and safety of Immunate solvent detergent previously treated patients with severe haemophilia A // Haemophilia. – 2007. – Vol. 13, № 1. – P. 9-11.
4. Белоусов В.П., Белоусова И.М., Крисько А.В. и др. Водный мицеллярный раствор C<sub>60</sub>: получение, некоторые свойства и способность к генерации синглетного кислорода // Журнал общей химии. – 2006. – Т. 76. – С. 56-57.
5. C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene / H. Kroto, J. Heath, S. O'Brien et al. // *Natura*. – 1985. – Vol. 10, № 9.– P. 162-163.
6. Фуллерены: фотодинамические процессы и новые подходы в медицине / Л.Б. Пиотровский, И.М. Белоусова, О.Б. Киселев и др. // СПб.: Роза мира, 2005. – 139 с.
7. Пикудза О.И., Маянский А.Н. Клинические перспективы изучения фагоцитоза // Казанский медицинский журнал. – 1994. – № 3. – С. 193-196.
8. Нагоев Б.С., Шубич М.Г. Значение теста восстановления нитросинего тетразолия для изучения функциональной активности лейкоцитов // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 195-198.
9. Волкова С.Д. Информационность НСТ-теста в практике иммунного донорства, в диагностике бактериальных и вирусных инфекций и контроле эффективности терапии // Вестник службы крови России. – 2008. – № 3. – С. 10-14.