

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСОВ В ПЛАЗМЕ ДОНОРСКОЙ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ФУЛЛЕРЕНОВ

Член-корреспондент РАМН СЕЛИВАНОВ Е. А., СИВАКОВА Н. П., ИВАНОВА Р. П.,  
ПЕТРОВА А. Л., БЕЛОУСОВА И. М.<sup>1</sup>, МУРАВЬЕВА Т. Д.<sup>1</sup>

ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии  
Федерального медико-биологического агентства»,

<sup>1</sup>ФГУП «Научно-производственная корпорация «Государственный оптический  
институт имени С. И. Вавилова»,  
Санкт-Петербург

**Селиванов Е. А., Сивакова Н. П., Иванова Р. П., Петрова А. Л., Белоусова И. М., Муравьева Т. Д.** Новые подходы к фотодинамической инактивации вирусов в плазме донорской крови с помощью фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов // Мед. академ. журн. 2009. Т. 9. № 4. С. 83–86. ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; ФГУП «Научно-производственная корпорация «Государственный оптический институт имени С. И. Вавилова», Санкт-Петербург, 191024, ул. 2-я Советская, 16.

Проблема снижения уровня риска передачи различных инфекций при переливании донорской крови, ее компонентов и препаратов остается в отечественной медицине одной из наиболее актуальных. В настоящее время, по данным Всемирной организации здравоохранения, каждому десятому из госпитализированных пациентов требуется кровь, ее компоненты или препараты. Среди методов инактивации патогенов в донорских компонентах и препаратах фотодинамическая инактивация возбудителей инфекций является одним из наиболее перспективных и гарантированных способов. В работе рассматривается новый подход к фотодинамической инактивации вирусов в плазме донорской крови с использованием твердофазных фотосенсибилизаторов на основе наноструктур-фуллеренов.

**Ключевые слова:** плазма донорской крови, гемотрансмиссивные инфекции, фотодинамическая инактивация, фотосенсибилизаторы на основе наноструктур-фуллеренов.

**Selivanov E. A., Sivakova N. P., Ivanova R. P., Petrova A. L., Belousova I. M., Muravjova T. D.** New approaches to donor plasma photodynamic pathogen-inactivation on the base of fullerenes-containing photosensibilization agents // Med. Acad. Journ. 2009. Vol. 9. № 4. P. 83–86. Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024.

The problem of transfusion-transmissible infections risk reduction remains one of the actual problems of transfusion medicine in Russia. As to WHO data, each tenth patient needs blood or blood components and preparations transfusions. Pathogen-reduction (inactivation) provides a proactive approach to reducing transfusion-transmissible infections. Several pathogen-inactivation technologies are being developed, with photodynamic inactivation as one of the promising approaches. The article is devoted to a new photodynamic pathogen-inactivation method on the base of fullerenes-nanostructures.

**Key words:** donor plasma, transfusion-transmissible infections, blood safety, pathogen reduction, photodynamic inactivation, fullerenes-nanostructures.

Передача инфекций с плазмой донорской крови при трансфузии является одним из путей заражения реципиентов и распространения таких опасных инфекций, как гепатит, ВИЧ-инфекция и сифилис. Кроме того, за последние годы в группу заболеваний, передающихся при переливании крови и ее компонентов, попали еще более 30 «новых» инфекционных болезней человека, и, видимо, эта группа будет постоянно увеличиваться.

В ряде стран в последнее десятилетие по рекомендации ВОЗ был введен ряд инактивационных технологий при производстве донорской плазмы крови, позволяющих снизить риск заражения инфекционными заболеваниями при трансфузии. К числу технологий, используемых в настоящее время

за рубежом, можно отнести: обработку плазмы растворителем/детергентом, многократный цикл заморозки-разморозки, обработку плазмы с помощью фотосенсибилизатора на основе красителя метиленового синего.

В России в качестве средства профилактики передачи гемотрансмиссивных инфекций используется, как правило, метод карантинизации донорской плазмы, т. е. ее хранения в течение возможного серонегативного периода при отрицательной температуре. Впоследствии проводят повторное исследование крови донора для подтверждения ее вирусной безопасности. Этот метод является весьма затратным.

Ранее Институтом лазерной физики ФГУП «НПК «ГОИ им. С. И. Вавилова», Институтом гриппа

РАМН и Институтом экспериментальной медицины РАМН был предложен и апробирован новый подход к инактивации вирусов в биологических жидкостях (на примере вируса гриппа) с помощью фотодинамического метода на основе фуллеренов.

Фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов обладают высокой эффективностью образования активных форм кислорода, воздействующих на вирусы. Важной особенностью данного типа фотосенсибилизаторов является их высокая фотохимическая стабильность, т. е. отсутствие побочных вредных продуктов при фотодинамическом воздействии, а также возможность извлечь фотосенсибилизаторы из биологической среды после фотодинамического воздействия.

Авторы данной работы попытались использовать эти уникальные свойства новых фотосенсибилизаторов применительно к биологическим системам и прежде всего к плазме донорской крови.

Для этого были проведены исследования по разработке новых типов фотосенсибилизаторов — твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов, изучены их структурные особенности и проведены исследования по оптимизации генерации синглетного кислорода этими структурами. На основании проведенной работы выбран наиболее эффективный фотосенсибилизатор на основе микрочастиц силикагеля, покрытых фуллеренами  $C_{60}$ , поскольку он обладает простотой получения, эффективной генерацией синглетного кислорода, большой удельной поверхностью и может быть полностью извлечен из биологической жидкости.

Проведено изучение свойств твердофазного фотосенсибилизатора на основе фуллеренов с точки зрения его фотостабильности и механической прочности.

Фуллерены открыты в 1985 г (Крото, Смолли, О'Брайн, Кёрл). Фуллерены — многоатомные молекулы, состоящие из атомов углерода ( $n > 20$ ). Наиболее детально изученной и используемой на практике является молекула  $C_{60}$ . Молекула  $C_{60}$  — «бакминстерфуллерен», состоит из 60 атомов углерода, располо-

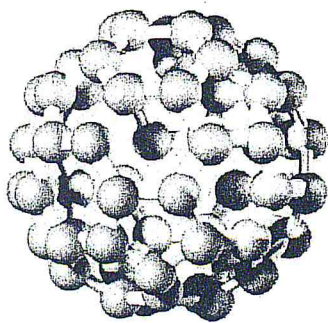


Рис. 1. Структура фуллерена  $C_{60}$

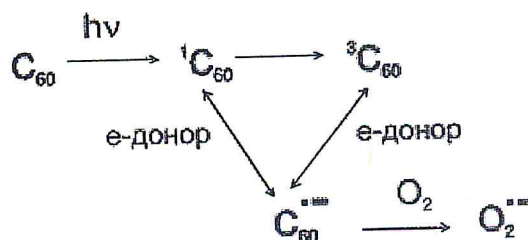
женных на сферической поверхности в вершинах 20 правильных шестиугольников и 12 правильных пятиугольников.

Электронная оболочка молекул состоит из делокализованных  $\pi$ -сопряженных электронов. Это определяет свойства фуллеренов как эффективных фотосенсибилизаторов. Фуллерены генерируют активные формы кислорода при воздействии освещения в присутствии кислорода. Возможно образование двух активных форм кислорода: синглетного кислорода  $^1\Delta_g O_2$  и супероксид-анион-радикала  $O_2^-$ .



Образование синглетного кислорода происходит при взаимодействии фотовозбужденных молекул фуллерена, перешедших в триплетное состояние, с молекулярным кислородом.

Образование супероксид-анион-радикала кислорода происходит при переносе электрона в донорно-акцепторном взаимодействии фотовозбужденной молекулы фуллерена, при наличии донора электронов, с получением анион-радикала  $C_{60}^-$ , а затем при взаимодействии с кислородом супер-анион-радикала кислорода  $O_2^-$ .



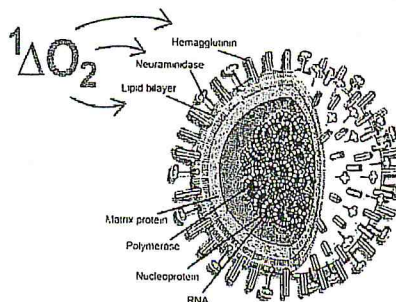
В качестве донора может выступать биологическая молекула. Как показали предварительные исследования, инактивация вирусов с помощью фуллеренов происходит в основном посредством воздействия на вирусы синглетным кислородом.

Подчеркнем важные преимущества фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов по сравнению с традиционными фотосенсибилизаторами на основе красителей (например, метиленового синего):

- широкий спектр поглощения в видимой области спектра;
- высокая фотохимическая стабильность. Отсутствие вредных побочных продуктов фотохимической реакции и расхода фотосенсибилизаторов;
- фуллерены не растворимы в водных и биологических жидкостях, что позволяет удалять их из биологической среды после процесса фотодинамического воздействия.

Фотодинамическая инаktivация вирусов с использованием фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов

Фотодинамическая инаktivация вирусов в биологических жидкостях обеспечивается активными формами кислорода, производимого твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллеренов.



Синглетный кислород воздействует на липидные мембраны оболочечных вирусов и на поверхностный альбумин необолочечных вирусов.

Рис. 2. Механизм фотодинамической инаktivации вирусов с использованием фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов

### ФУЛЛЕРЕНЫ, НАНЕСЕННЫЕ НА МИКРОЧАСТИЦЫ СИЛИКАГЕЛЯ

С целью увеличения рабочей площади поверхности твердофазных сенсibilизаторов авторами данной работы предложен и разработан способ нанесения покрытия из фуллерена на частицы силикагеля. В качестве матрицы был выбран мелкопористый силикагель марки КСК, который в настоящее время находит широкое практическое применение в медицинской промышленности. Была выбрана фракция частиц мелкопористого силикагеля размером 20 мкм. Размер пор составлял 100 Å.

Как было показано, полученные твердофазные композиции, представляющие собой частицы силикагеля с нанесенным на них слоем фуллерена, отличались высокой прочностью иммобилизованного слоя, воспроизводимостью свойств независимо от партии получения и хорошей смачиваемостью в воде.

Наиболее перспективными твердофазными фуллеренсодержащими фотосенсибилизаторами являются композиции, представляющие собой частицы силикагеля с нанесенным на них слоем фуллерена, поскольку именно они обладают большой площадью рабочей поверхности, содержащей фуллерен, характеризуются удобством при работе с ними и при извлечении их из вязких биологических жидкостей.

При разработке схемы инаktivации возбудителей гемотрансмиссивных инфекций в плазме донорской крови учитывались:

- общие принципы фотодинамического воздействия на биологические объекты;
- необходимость обработки плазмы при невысоких температурах и в стерильных условиях;

– использование одноразовых контейнеров на всех этапах обработки;

– специфика проведения процесса фотодинамической инаktivации донорской плазмы с помощью новых твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов;

– необходимость осуществления управления и контроля за процессом фотодинамической инаktivации.

Было изучено влияние фотодинамического воздействия на компоненты гемостаза: ф. VIII, ф. Виллебранда, АПТВ, протромбиновый комплекс. Следует еще раз подчеркнуть, что система гемостаза представляет собой весьма лабильную белковую композицию. Практически любое воздействие на плазму, а именно: фильтрация, хранение, обработка инаktivирующими агентами, неминуемо приводит к нарушению данной системы. Наша задача заключалась в том, чтобы найти наиболее щадящие условия фотодинамического воздействия, при которых уровень активности основных компонентов гемостаза находился бы в интервале допустимых значений, установленных ВОЗ. В результате исследований были определены оптимальные условия, обеспечивающие допустимое фотодинамическое воздействие на систему свертывания крови.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложен новый подход к инаktivации вирусов в плазме донорской крови с помощью твердофазных фотосенсибилизаторов на основе наноструктур-фуллеренов.

2. Выработаны требования к фотосенсибилизаторам на основе фуллеренов.

Фотосенсибилизаторы для инактивации вирусов в биологической жидкости должны обладать следующими свойствами:

- хорошей смачиваемостью в жидкой среде;
- высокой эффективностью генерации синглетного кислорода в гетерофазных условиях;
- фотостабильностью под воздействием излучения в биологической среде;
- химической и физической устойчивостью в биологической среде;
- высокой способностью к инактивации вирусов в биологических жидкостях, обладающих высокой вязкостью;
- простотой получения, технологичностью и воспроизводимостью физико-химических свойств;
- возможностью полного и легкого извлечения из биологической среды после процедуры фотодинамического воздействия.

3. Проведены исследования по фотодинамическому воздействию разработанного твердофазного фотосенсибилизатора на основе микрочастиц силикагеля, покрытых фуллереном, на коагулологические свойства плазмы донорской крови.

Учитывая сохранение без изменения содержания общего белка в обработанной плазме, отсутствие цитотоксичности плазмы, прошедшей фотодинамическую обработку, а также то, что фотодинамическая инактивация плазмы с помощью фуллеренсодержащих нанокompозитных фотосенсибилизаторов не ведет к существенным изменениям параметров системы гемостаза донорской плазмы, данный метод может быть рекомендован для дальнейшего изучения инактивации вирусов в плазме донорской крови.

#### Литература

1. Балаян М.С. Вирусные гепатиты // Новое в трансфузиологии. 2000. № 25. С. 67–74.
2. Белоусов В.П., Белоусова И.М., Будтов В.П., Данилов В.В. Фуллерены: структурные, физико-химические и нелинейно-оптические свойства // Оптический журн. 1997. Т. 6. № 12. С. 3–37.
3. Голосова Т.В., Сомова А.В., Ковалева Е.П. Организация и стратегия профилактики вирусных инфекций в учреждениях службы крови // Пробл. гематол. и перелив. крови. 1996. № 1. С. 5–10.
4. Голосова Т.В., Сомова А.В., Туполева Т.А. и др. Оценка риска передачи вирусных инфекций при гемотрансфузиях // Вестник Службы крови России. 2000. № 2. С. 25–32.
5. Голосова Т.В., Никитин И.К. Гемотрансмиссивные инфекции. М., 2003.
6. Самонин В.В., Никонова В.Ю., Спиридонова Е.А. Влияние оптического облучения на сорбционные свойства фуллереновых материалов // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81. № 8. С. 1–6.
7. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н., Григорьян М.Ш., Воробей Л.Г. Характеристика деятельности учреждений Службы крови России в 2007 году // Трансфузиология. 2008. Т. 9. № 3. С. 4–26.
8. Arbogast Y.W., Darmany A.P., Foote Ch.S. Photophysical properties of C60 // J. Phys. Chem. 1991. Vol. 95. P. 11–15.
9. Bianco C. West Nile Virus Transmission by Blood Transfusion and transplantation // Blood Therapies in Med. 2003. Vol. 3. P. 78–83.
10. Burnouf T., Goubran H.A., Radosevich M., Sayed M.A. et al. A process for solvent/detergent treatment of plasma for transfusion at blood centers that use a disposable-bag system // Human Plasma Product Services. Lille. France Transfusion. 2006. Vol. 12 (Dec.46). P. 2100–2108.
11. Zarubaev V.V. PhD, Belousova I.M., Kiselev O.I. et al. Photodynamic inactivation of influenza virus with fullerene C60 suspension in allantoic fluid // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2007. Vol. 4. P. 31–35.
12. Hardwick C.C., Herivel T. R. et al. // Photochemistry and Photobiology. 2004. Vol. 80. P. 609–615.
13. Kasermann F., Kempf C. Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses // Rev. Med. Virol. 1998. Vol. 8. P. 143–151.
14. Riedier G.F., Haycox A.R., Duggan A.K., Dakin H.A. Cost-effectiveness of solvent-treated fresh-frozen plasma // Vox Sangvini. 2003. Vol. 85 (2). P. 88–95.
15. Snelling D.R. Production of singlet oxygen in the benzene oxygen photo-chemical system // Chem. Phys. Letters. 1968. Vol. 2. № 5. P. 346–348.