

**Нижегородский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора
г. Нижний Новгород**

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
ЯВЛЕНИЙ ФОТОРАДИОЛИЗА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ
ВИРУСОВ В ПЛАЗМЕ ДОНОРСКОЙ КРОВИ НА
МОДЕЛИ ФАГОВ PS.AERUQINOSA**

**В.Н. Мазепа, А.Б. Строганов, Ю.В.
Толмосов, А.В. Цимбалов, Д.В. Блинов**

Введение

Передача инфекций при переливании компонентов донорской крови и использовании лечебных препаратов, полученных из нее, является одним из путей заражения пациентов вирусными гепатитами, ВИЧ и другими опасными инфекциями. Тем более, что в последние годы в группу заболеваний, передающихся при гемотрансфузиях, попали еще более 30 “новых” инфекционных болезней человека и, видимо, эта группа будет постоянно увеличиваться. Поэтому весьма актуальным направлением развития гемотрансфузиологии является разработка методов инаktivации инфекционных агентов, обеспечивающих минимальный уровень риска передачи гемотрансмиссивных инфекций при введении реципиентам донорской плазмы и препаратов из нее.

Существуют самые разнообразные способы инаktivации вирусных патогенов, основанные на воздействии физических, химических факторов на вирусы. К таким способам относятся метод постепенной, многостадийной тепловой обработкой препаратов крови: фибриногена и факторов свертывания крови VIII, IX. Однако тепловые способы инаktivации не обеспечивают полноценной инаktivации таких вирусных патогенов как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит В. Также к физическим методам инаktivации вирусов относится использование γ -облучения. Но гамма-облучение обладает инаktivирующим воздействием на функционально активные и необходимые белковые компоненты плазменной фракции. Химические методы инаktivации вирусов такие как применение фенола для этих целей, задерживает высокая токсичность бензольных и им подобных соединений. Одним из актуальных направлений в сфере борьбы с вирусными патогенами в препаратах донорской крови является применение методов инаktivации, основанных на фотодинамических реакциях выделения синглетного кислорода. Наибольшее распространение в этой сфере получило использование фенотиазиновых красителей (метиленовый синий) и твердофазных фуллеренов. Радиолиз водных сред также ведет к образованию активных форм кислорода. Однако оценить эффект действия радиолиза на вирусные частицы достаточно трудно, поскольку вирусы человека с парэнтеральным механизмом передачи не культивируются в лабораторных условиях в связи с чем не имеется возможности оценить их жизнеспособность после обработки. В качестве модельной системы для изучения эффекта радиолиза могут быть использованы бактериофаги - вирусы бактерий. Их частицы достаточно близки по структуре вирусам человека, также состоят из нуклеиновых кислот и белков, но в отличие от вирусов человека они не содержат липидов, что делает их еще более устойчивыми. Бактериофаги хорошо размножаются на газоне чувствительных бактерий, концентрация жизнеспособного фага оценивается по количеству выросших негативных колоний по методу Грация []

В связи с этим была определена цель нашего исследования.

Цель исследования:

Оценка влияния продуктов фоторадиолиза на жизнеспособность вирусов бактерий в плазме крови, на модели бактериофагов *Ps.aeruginosa*.



Материалы и методы исследования

В проведённом исследовании использовалась следующая методика воздействия на модельный бактериофаг в донорской плазме. Проводилось ультрафиолетовое облучение донорской плазмы в смеси с физиологическим раствором хлорида натрия в соотношении 3:1, содержащей бактериофаг, в универсальной кювете однократного применения (кювета УФОК для аппарата УФО крови «Надежда» с толщиной пленки 50 мкм) в диапазоне генерации облучения лампы ИВР (индукционная всеволновая ртутная) от 185 нм до 375 нм на модификации аппарата УФО крови «Надежда О2». Облучение коротковолновой ультрафиолетовой частью спектра УФ-С (180нм - 280нм), обеспечивающей максимальный бактерицидный эффект в диапазоне 254 нм стало возможным при заполнении герметичной легко разборной конструкции камеры отражателя лампы ИВР инертным газом аргоном Ag в модификации аппарата УФО «Надежда О2». При этом облучение инактивируемой донорской плазмы проводилось проточным способом путем ее прокачки перистальтическим насосом с дискретными скоростями 4,6 мл/мин, 6,2 мл/мин, 7,2 мл/мин через кювету с толщиной пленки 50 мкм.

Данный способ инактивации вирусов основан на реакциях фотолитического радиолиза водных сред, при которых под воздействием ультрафиолетового облучения происходит образование короткоживущих гидроксильных радикалов $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 донором которых является физиологический раствор, находящийся в смеси с облучаемой средой. Необходимость добавления физиологического раствора хлорида натрия диктовалась следующим предположением: водная среда в крови и её производных находится в связанном состоянии с крупными молекулярными единицами и вероятно не может выступать в качестве донора активных радикалов. Влияние на объект активных свободных радикалов $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 и молекулярных продуктов, например, перекиси водорода, образующихся в среде вследствие радиолиза воды проявляется во взаимодействии их с генетическим аппаратом вируса. Наиболее уязвимыми мишенями при этом являются пуриновые и пиримидиновые основания [ссылка].

Материалом для исследования была плазма, содержащая бактериофаг *Pseudomonas aeruginosa*. Этот бактериофаг был выбран так как он образует крупные негативные колонии, что удобно для учета. Определение количества (концентрации) жизнеспособного бактериофага после проведения процедуры инактивации проводилась методом титрования Грация [].

Эксперимент проводился следующим образом: 300 мл плазмы было разделено на 6 аликвот по 50 мл в каждой, в каждую аликвоту вносилось по 5мл бактериофага таким образом, что концентрация фаговых частиц в них составила 1×10^7 частиц в мл. Одна аликвота – контрольная, помещалась на время эксперимента в холодильник, пять других аликвот подвергались процедуре инактивации по способу, предложенному авторами, в режимах, описанных ниже. Процедура инактивации культур бактериофага в крови проводилась в пяти сериях опытов:

- Серия №1 – облучение 50 мл плазмы крови суспензированной с культурой бактериофага в концентрации 1×10^7 частиц в мл проводилось при следующих условиях: камера отражателя источника излучения заполнена кислородом под давлением 90 мм.рт.ст.; скорость пролива плазмы через кювету – 4,6 мл/мин.
- Серия №2 – облучение 50 мл плазмы суспензированной с культурой бактериофага в концентрации 1×10^7 частиц в мл и физиологическим раствором хлорида натрия в соотношении 3:1 соответственно проводилось при следующих условиях: камера отражателя заполнена инертным газом аргоном под давлением 30 мм.рт.ст.; скорость пролива плазмы через кювету – 4,6 мл/мин.
- Серия №3 – облучение 50 мл плазмы суспензированной с культурой бактериофага в концентрации 1×10^7 частиц в мл и физиологическим раствором хлорида натрия в соотношении 3:1 соответственно проводилось при следующих условиях: камера отражателя заполнена инертным газом аргоном под давлением 30 мм.рт.ст.; скорость пролива плазмы через кювету – 6,2 мл/мин.
- Серия №4 – облучение 50 мл плазмы суспензированной с культурой бактериофага в концентрации 1×10^7 частиц в мл и физиологическим раствором хлорида натрия в соотношении 3:1 соответственно проводилось при следующих условиях: камера отражателя заполнена инертным газом аргоном под давлением 30 мм.рт.ст.; скорость пролива плазмы через кювету – 7,2 мл/мин.
- Серия №5 – облучение 50 мл плазмы крови суспензированной с культурой бактериофага в концентрации 1×10^7 частиц в мл проводилось при следующих условиях: камера отражателя источника излучения заполнена инертным газом аргоном под давлением 30 мм.рт.ст.; скорость пролива плазмы через кювету – 4,6 мл/мин.

После проведения процедур инактивации для каждой из 5 аликвот и контроля были приготовлены серии десятикратных разведений в 10, 100, 1000, 10000 раз в физиологическом растворе. Из разведений в 100, 1000, 10000 для всех аликвот по 0,1 мл вносилось в 2мл расплавленного 0,7% мясо-пептонного агара, содержащего бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, агар перемешивался и выливался на поверхность 1,8% мясо-пептонного агара в чашке Петри, чашки инкубировались 24 часа при температуре 37°C. Жизнеспособность бактериофага оценивалась по количеству негативных колоний фага. На фоне сплошного бактериального роста жизнеспособные фаговые частицы образуют прозрачные пятна – негативные колонии, нежизнеспособный, инактивированный бактериофаг негативных колоний не образует.

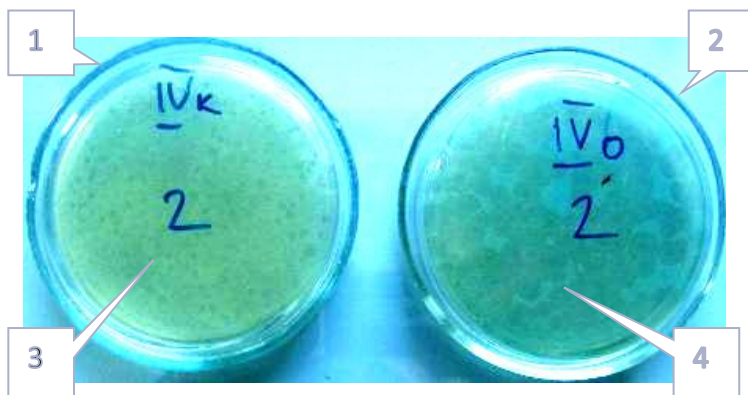
Результаты и обсуждение

Наличие негативных колоний в контрольном и опытном посевах

Рис. 1

Результат посева плазмы на мясо-пептонный агар в опыте серии №1

В опыте серии №1 при заданных параметрах облучения инактивации бактериофага не произошло. Данный результат по всей вероятности связан с тем, что жёсткое УФ излучение 180-280 нм с повышенной энергией фотонов тратится на образование озона из кислорода, которым была заполнена камера отражателя.

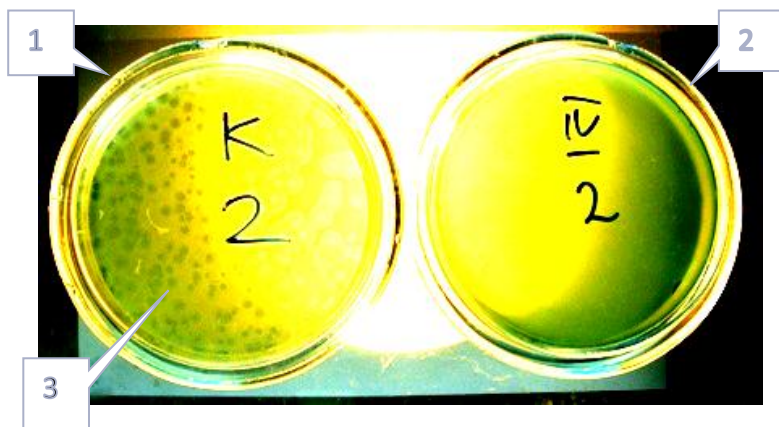


1. контрольный посев
2. опыт
3. негативные колонии бактериофага в контрольном посеве
4. негативные колонии в опытном посеве

Рис. 2

Результат посева плазмы на мясо-пептонный агар в опыте серии №2

В опыте серии №2 бактериофаг *Pseudomonas aeruginosa* был полностью инактивирован. Об этом свидетельствует отсутствие негативных колоний вируса в опытном посеве, при значительном их количестве в контрольном посеве (Рис. 2).



1. контрольный посев
2. опыт
3. негативные колонии бактериофага в контрольном посеве

Рис. 3

Результат посева плазмы на мясо-пептонный агар в опыте серии №3

В опытах серии №3 также наблюдалась полная инактивация фага. Это подтверждается отсутствием негативных колоний бактериофага *Pseudomonas aeruginosa* в опытном посеве (Рис. 3). Положительные результаты опытов в сериях №2 и №3 вероятно связаны с наличием свободных гидроксильных групп, донором которых является физиологический раствор, а также с оптимальной скоростью пролива плазмы через кювету. Для подтверждения роли вышеперечисленных факторов в инактивации бактериофага были проведены опыты серий №4 и №5.

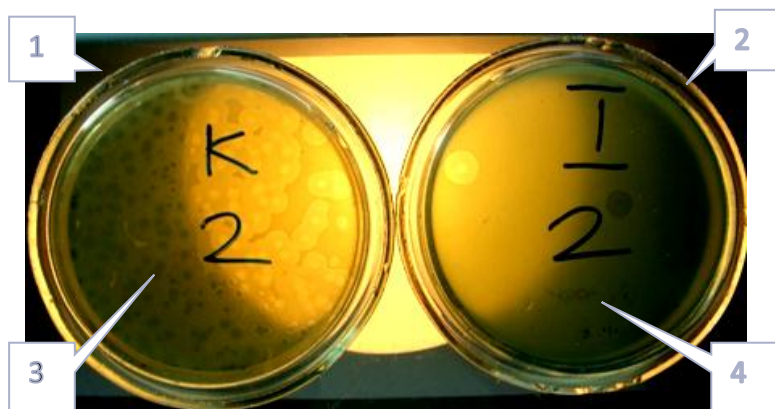


1. контрольный посев
2. опыт
3. негативные колонии бактериофага в контрольном посеве

Рис. 4

Результат посева плазмы на мясо-пептонный агар в опыте серии №4

При проведении опытов серии №4 при заданных параметрах облучения произошла частичная инактивация бактериофага. Обнаружены 3 негативные колонии в опытном посеве (Рис. 4). Данный эффект связан с более высокой скоростью прокачки плазмы через кювету, чем в опытах серий №2 и №3. Обратно пропорционально увеличению скорости пролива плазмы уменьшается и время УФО раствора.

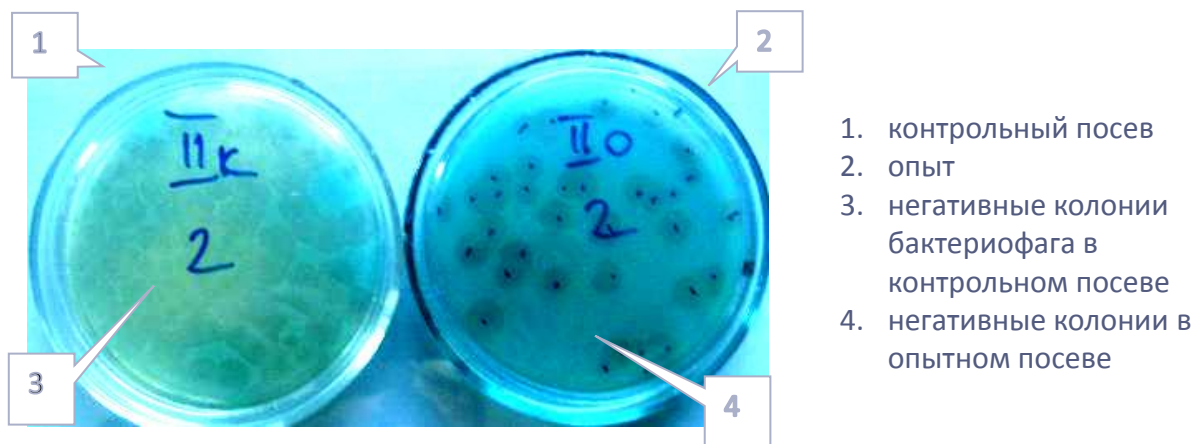


1. контрольный посев
2. опыт
3. негативные колонии бактериофага в контрольном посеве
4. негативные колонии в опытном посеве

Рис. 5

Результат посева плазмы на мясо-пептонный агар в опыте серии №5

При проведении процедуры инактивации без добавления физиологического раствора в облучаемую среду в опытах серии №5 жизнеспособность бактериофага сохранилась (Рис. 5).



Учитывая более высокую устойчивость бактериофагов по сравнению с вирусами человека и животных, можно предполагать, что при аналогичной обработке вирусы человека также будут инактивироваться как и бактериофаги. Но, безусловно, более адекватными являются исследования основанные на определении жизнеспособности вирусов человека с парентеральным механизмом передачи.

Выводы

В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- Показана работоспособность модельной системы оценки инактивации вирусов в плазме крови, основанная на определении жизнеспособности фага *Ps.aeruginosa* до и после радиолиза контаминированной донорской плазмы.
- Инактивация модельного бактериофага методом фоторадиолиза наиболее эффективно происходит при следующих условиях: разведение облучаемой среды физиологическим раствором хлорида натрия, заполнении камеры отражателя источника излучения инертным газом аргоном и скорости прокачки плазмы через кювету 4,6-6,2 мл/мин.
- Отсутствие в облучаемой среде физиологического раствора, несвязанного с крупными молекулярными структурами, ведет к сохранению жизнеспособности фага в донорской плазме после облучения.

Источники информации

1. Пикаев А.К., Кабакчи С.А., Макаров И.Е., Ершов Б.Г., Импульсный радиолиз воды и водных растворов: Атомиздат: Москва, 1995., 19-47с.
2. Способ инактивации вируса иммунодефицита человека и других вирусов в плазме крови человека с сохранением функциональной активности белков плазмы крови // Тимофеев И.В., Вараксин Н.А., Перминова Н.Г., Нечаева Е.А.; Дядин Ю.А., Журко Ф.В., Патент на изобретение № 2152994, С12N7/04 (20.07.2000).
3. Пиотровский Л.Б., Белоусова И.М., Данилов О.Б. , Киселев О.И., Фуллерены: фотодинамические процессы и новые подходы в медицине: Роза мира: Санкт-Петербург, 2005 г. 75 с.
4. Белоусов В.П., Белоусова И.М., Крисько А.В., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д., Сироткин А.К.. Водный мицеллярный раствор C60: получение, некоторые свойства и способность к генерации синглетного кислорода // Журнал общей химии. – 2006. – Т. 76, № 2. – С. 265-272.
5. Б. Г. Ершов, А. В. Гордеев «Диффузионно-кинетическая модель радиолиза воды и водных растворов» // кн.: «Современные проблемы физической химии». — М.: Граница, 2005. С. 520—542.
6. М. Адамс. Бактериофаги. М. Иностранная литература. 1960 (1959) с.