

Фотодинамічний метод знезараження інфікованої гемотрансмисивними вірусами плазми крові донорів

А.С.Тимченко, С.Ю.Сергутіна

Інститут гематології та трансфузіології АМН України
Київ, Україна

У роботі наведені дані щодо ефективного знезараження пулів інфікованої гемотрансмисивними вірусами плазми крові донорів із використанням фотосенсибілізатора метиленового синього і дозованого опромінення ультрафіолетовим і видимим світлом.

Ключові слова: плазма крові донорів, гемотрансмисивні віруси, фотосенсибілізатор метиленовий синій, спектри поглинання.

Вступ

Плазма крові донорів використовується не тільки як гемотрансфузійне середовище в клінічній практиці, але й в якості сировини для отримання специфічних і неспецифічних білкових препаратів у виробничій гемотрансфузіології. На сьогодні донорська кров обстежується згідно з Наказом МОЗ України «Про інфекційну безпеку донорської крові та її компонентів» №385 від 01.08.2005 р. тільки на маркери гепатитів В і С, ВІЛ 1 і 2 типів та сифілісу. Інші гемотрансмисивні віруси (наприклад, віруси гепатитів D, E, F, G, TT, родини герпес, Західного Нілу, парвовірус В19 та ін.) вітчизняною службою крові не визначаються. На превеликий жаль, через економічні труднощі в Україні відсутній моніторинг донорської крові за допомогою генної ампліфікації на основі полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), що знижує інфекційну безпеку такого цінного компонента крові, як плазма. На сьогодні у вітчизняній виробничій трансфузіології одним із методів попередження гемотрансфузійних інфекцій є карантинізація (протягом 6 міс.) свіжозамороженої плазми (СЗП) [1]. Але цей метод не задовольняє фахівців служби крові як економічно, так і з точки зору інфекційної безпеки [2]. Вважається, що більш перспективним та ефективнішим є шлях підвищення безпеки через впровадження сучасних методів знезараження та/або видалення інфекційних агентів із плазми крові донорів. Це підтверджено успіхами провідних світових виробників препаратів крові: комбіноване застосування сучасних методів тестування донорського контингенту й

знезараження сировини (плазми крові) призводить до високої якості препаратів крові, що отримуються з неї, та їх інфекційної безпеки. Одним із таких методів, що використовується за кордоном для знезараження вірусів у донорській плазмі, є фізико-хімічний (фотодинамічний) метод. В основі цього методу лежить здатність хімічної речовини (фотосенсибілізатора) під дією опромінення певної довжини хвилі продукувати синглетний (високоактивний) кисень, що ушкоджує геном простих (безоболонкових) і складних (оболонкових) вірусів і тим самим перериває процес їхнього відтворення та подальшого інфікування [3].

Метою дослідження було визначити найбільш ефективний режим фотодинамічного знезараження пулу інфікованої гемотрансмисивними вірусами донорської плазми з використанням фотосенсибілізатора метиленового синього (МС) і дозованого опромінення ультрафіолетовим і видимим світлом.

Матеріали та методи дослідження

У дослідах використовували зразки відбракованої Київським міським центром крові СЗП, інфіковані гемотрансмисивними вірусами (віруси гепатитів В і С). Після відтаювання при температурі 37°C та центрифугування протягом 20 хв. при швидкості обертання 3000 об./хв. їх об'єднували в пули (суміш плазм крові від 3-4 донорів у рівних об'ємах) для подальшого дослідження.

Ефективність інактивації вірусів гепатитів В і С у дослідних зразках визначали метода-

ми імуноферментного аналізу (ІФА) із застосуванням тест-систем фірми «DiaProphMed» (Україна) та ампліфікації нуклеїнових кислот на основі ПЛР (тест-набори «AmpliSens HBV» і «AmpliSens HCV» (Росія).

Фотосенсибілізацію донорської плазми проводили феногіазиним барвником метиленовим синім (МС, ф. «Merck», Німеччина) з молекулярною масою 374. У досліджах були використані розчини МС у концентраціях від $2 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Спектри поглинання розчинів МС реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-46 («Ломо», Росія).

УФ-опромінення дослідних зразків пулів плазми крові проводили за допомогою експериментальної моделі «Пристрою для знезараження рідини» (декларційний патент України №7835 від 15.07.2005 р.) [4]. Дозу опромінення ультрафіолетовим ($\lambda=254$ нм) та видимим ($\lambda=640$ нм) світлом, що складала 75, 90 і 120 Дж, контролювали за допомогою напівпровідникового детектора (кремнієвий фотодіод) КВАНТ-1 (Україна). Підбір доз опромінення проводили при фіксованому об'ємі плазми крові.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням методів варіаційної статистики за допомогою прикладних програм «STATISTICA» на комп'ютері з програмним забезпеченням «Ексел» [5]. Результати аналізу вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

У попередніх дослідженнях при вивченні спектрів поглинання розчинів фотосенсибілізатора МС у двох спектральних областях (200–350 і 550–700 нм) нами була показана наявність двох смуг поглинання у видимій області спектра в діапазоні довжин хвиль від 500 до 700 нм [6], що підтверджується даними літератури [7]. При дослідженні поглинаючої здатності розчинів фотосенсибілізатора в ультрафіолетовій області спектра також була виявлена наявність двох смуг поглинання з максимумами близько 260 нм (смуга поглинання димерів МС) та 300 нм (смуга поглинання мономерів МС), хоча й менш інтенсивна, ніж у видимій області спектра [6]. Це свідчить про здатність МС поглинати УФ-промені і тим самим виявляти фотосенсибілізуючі властивості в ультрафіолетовій області спектра.

Враховуючи вищезазначене, нашим завданням було підібрати ефективну концентрацію фотосенсибілізатора МС для проведення фотодинамічної інактивації пулу плазми крові донорів, інфікованої вірусами гепатитів В і С.

Із наукової літератури відомо, що процеси димеризації запобігають взаємодії МС із білками плазми крові [7]. Тому при спектральному дослідженні необхідно було підібрати таку робочу концентрацію МС, коли зв'язування фотосенсибілізатора з білками плазми крові найбільш ефективно. Для цього були вивчені спектри поглинання розчинів МС у концентраціях від $2 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Отримані результати досліджень спектрів поглинання різних концентрацій розчинів фотосенсибілізатора в максимумах смуг поглинання двох спектральних областей наведені на рис. 1.

Аналіз отриманих даних показав, що концентрація МС, яка дорівнює $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л (10 мкмоль/л), розмежовує діапазон концентрацій на дві області, відмінні кутом нахилу кривих оптичної густини (у точці, що відповідає концентрації 10 мкмоль/л, помітно «залом» кривих). Це свідчить про різні процеси, які відбуваються в розчинах МС: в області концентрацій менше 10 мкмоль/л спостерігається поглинання світла мономерами фотосенсибілізатора, тоді як в області концентрацій, які перевищують вищезазначене значення, відбувається димеризація молекул МС [7]. Особливо це добре видно по кривих 2 і 4, які відносяться до спектрів поглинання мономерів МС в двох спектральних областях.

При підвищенні концентрації МС у спектрах поглинання його розчинів проявляється димеризація фотосенсибілізатора (крива 3), яка перешкоджає взаємодії МС із білками, тому концентрація МС 10 мкмоль/л, на наш погляд, є оптимальною для проведення фотосенсибілізації пулу донорської плазми.

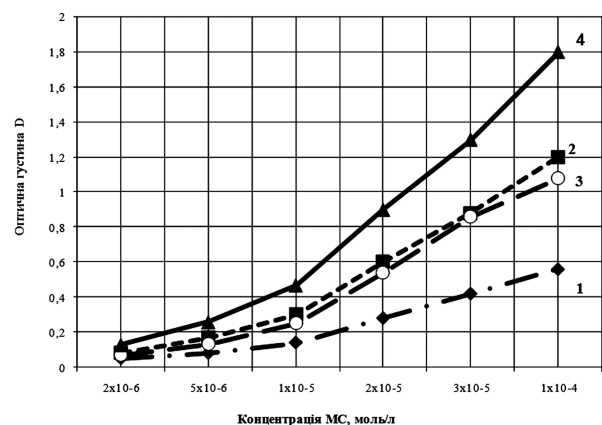


Рис. 1. Залежність оптичної густини розчинів МС від концентрації в максимумах смуг поглинання: крива 1 — при довжині хвилі 260 нм; крива 2 — при довжині хвилі 300 нм; крива 3 — при довжині хвилі 635 нм; крива 4 — при довжині хвилі 665 нм.

У проаналізованій науковій літературі для фотодинамічного знезараження плазми і компонентів крові рекомендується використовувати МС у концентрації 1 мкмоль/л [8-10], тоді як проведені нами дослідження на модельних вірусах показали, що найбільш ефективною є концентрація фотосенсибілізатора, яка дорівнює 10 мкмоль/л [11]. Результати проведених нами спектральних досліджень підтвердили попередні вірусологічні дані щодо ефективного використання МС у вказаній концентрації.

При дослідженні ефективності різних режимів фотодинамічного знезараження пулів інфікованої вірусами гепатитів В і С донорської плазми з використанням у якості фотосенсибілізатора МС було проведено три серії дослідів.

Попередню обробку зразків пулів донорської плазми фотосенсибілізатором МС проводили наступним чином: в асептичних умовах при кімнатній температурі без доступу видимого світла в пул інфікованої плазми додавали розчин МС, доводили до кінцевої концентрації 10 мкмоль/л і витримували протягом однієї години. Після цього плазму розділяли на частини й піддавали різним режимам обробки:

1. Фотосенсибілізація зразків пулів донорської плазми МС (кінцева концентрація в плазмі складала 10 мкмоль/л) протягом однієї години без доступу видимого світла.

2. УФ-опромінення зразків пулів фотосенсибілізованої донорської плазми в дозах від 75 до 120 Дж.

3. Опромінення плазми видимим світлом у дозах від 75 до 120 Дж через одну годину після додавання МС.

4. Комбіноване застосування УФ- і видимого світла в дозах 90 і 120 Дж для знезараження зразків пулів фотосенсибілізованої плазми.

При дослідженні ефективності застосування вищевказаних режимів фотодинамічної вірусінактивації пулів інфікованої донорської плазми методом ПЛР було встановлено, що повне знезараження вірусів гепатиту В і С відбувалось при застосуванні опромінення обробленої МС плазми як УФ-променями і видимим світлом окремо, так і при їх комбінованому застосуванні. Найбільш ефективна доза опромінення при окремому застосуванні вірусінактивуючих агентів (УФО і видимого світла) складала 120 Дж, тоді як при комбінованому дорівнювала 90 Дж.

Висновки

Найбільш ефективним режимом знезараження пулів плазми донорської крові, інфікованої вірусами гепатитів В і С, є комбіноване застосування фотосенсибілізатора метиленового синього у концентрації 10 мкмоль/л і опромінення УФ-променями та видимим світлом у дозі 90-120 Дж.

Література

1. Наказ МОЗ України «Про інфекційну безпеку донорської крові та її компонентів» №385 від 01.08.2005 р. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://www.moz.gov.ua/ua/main//docs/?docID=4252>
2. Новак В.Л. Вірусна безпека при виготовленні препаратів плазми крові: сучасні тенденції / В.Л.Новак, Т.В.Даниш // Журнал АМН України. — 2009. — Т. 15, №1. — С. 165-174.
3. Русанов В.М. Вирусная безопасность донорской плазмы / В.М.Русанов // Вестник службы крови России. — 2007. — №1. — С. 40-42.
4. Декларацийний патент на корисну модель 7835 UA, МПК⁷ С 02 F 1/32. Пристрій для знезаражування рідини / А.С.Тимченко, В.В.Бондар, С.Ю.Сергута; заявник та патентовласник Інститут гематології та трансфузіології АМН України. — №20041109664. Заявл. 24.11.2004. Опубл. 15.07.2005. Бюл. №7.
5. Бойко О.В. Практика використання пакета STATISTICA для аналізу медико-біологічних даних: Навч. посібник / О.В.Бойко. — К.: КМАПО ім. П.Л.Шупика, 2004. — 76 с.
6. Спектрально-люмінесцентні властивості плазми донорської крові при фотохімічній інактивації вірусів / А.С.Тимченко, С.Ю.Сергута, В.В.Бондар, С.Г.Неділько // Укр. журнал гематології та трансфузіології. — 2004. — №4 (4). — С. 31-36.
7. Bergmann K. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite / K.Bergmann, С.Т.О'Konski // J. Phys. Chem. — 1963. — Vol. 67. — P. 2169-2177.
8. Wagner S.J. Virus Inactivation in Blood Components by Photoactive Phenothiazine Dyes / S.J.Wagner // Transfus. Med. Reviews. — 2002. — Vol. 16, №1. — P. 61-66.
9. Stamoulis K. Virus inactivation of plasma and its derivatives / K. Stamoulis, K. Saffroniadou // Haema. — 2002. — Vol. 5, №3. — P. 213-221.
10. Wainwright M. Photoinactivation of viruses / M. Wainwright // Photochem. Photobiol. Sci. — 2004. — Vol. 3, №5. — P. 406-411.
11. Сергута С.Ю. Інактивація простих і складних модельних вірусів у плазмі донорської крові (експериментальні дослідження): Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.31 «Гематологія і трансфузіологія» / С.Ю.Сергута. — К.: Інститут гематології та трансфузіології АМН України, 2006. — 22 с.

А.С.Тимченко, С.Ю.Сергутина. Фотодинамический метод обеззараживания инфицированной гемотрансмиссивными вирусами плазмы крови доноров. Киев, Украина.

Ключевые слова: плазма крови доноров, гемотрансмиссивные вирусы, фотосенсибилизатор метиленовый синий, спектры поглощения.

В работе приведены данные относительно эффективного обеззараживания пулов инфицированной гемотрансмиссивными вирусами плазмы крови доноров с использованием фотосенсибилизатора метиленового синего и дозированного облучения ультрафиолетовым и видимым светом.

A.S.Timchenko, S.Yu.Sergutina. Photodynamic method of inactivation of donor blood plasma infected by hemotransmissible viruses. Kyiv, Ukraine.

Key words: donor blood plasma, hemotransmissible viruses, photosensitizer methylene blue, absorption spectrum.

The data about the effective inactivation of hemotransmissible viruses in pools of the donor blood plasma by means of photosensitizer methylene blue and ultraviolet and visible irradiation are given in the article.

Надійшла до редакції 01.03.2010 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасва, 2010

УДК 615.27: [616.33 + 616.348] — 08 — 053.4

Вибір етіотропної терапії при лікуванні ротавірусних гастроентероколітів у дітей

О.М.Ніконова, Є.В.Гріценко,
Е.А.Діка, І.М.Лашина, О.Б.Гвоздікова

Луганський державний медичний університет, кафедра медицини катастроф, анестезіології та інтенсивної терапії (завідувач — доцент Ю.І.Налапко)
Луганськ, Україна

Стаття присвячена оцінці ефективності раннього призначення циклоферона при лікуванні тяжких форм гострих гастроентероколітів ротавірусної етіології у дітей. Встановлено, що призначення етіотропного лікування вірусних діарей підвищує ефективність стандартної базової терапії та скорочує тривалість перебування дітей у реанімаційному відділенні.

Ключові слова: вірусний гастроентероколіт, лікування.

Вступ

Інфекційні хвороби посідають провідне місце серед загальної захворюваності в педіатрії. У спільній структурі інфекційних захворювань гостри кишкові інфекції (ГКІ) мають найбільше значення для дітей грудного і молодшого віку і складають 60-65% всіх випадків захворюваності [1].

Активне використання сучасних методів бактеріологічного і вірусологічного обстеження цих хворих дозволяє встановити етіологію ГКІ в 56-80% випадків. У літературі детально описуються ураження шлунково-кишкового тракту, що спричиняються бактеріями *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, однак на практиці ці збудники викликають не більше 10% всіх ви-

падків кишкових інфекцій у дітей в цивілізованих країнах, тоді як ротавірус є найважливішою причиною цих інфекцій у дітей в Європі. Доля ротавірусної інфекції (РВІ) в структурі ГКІ в педіатрії досягає 70% [2].

Відмінними рисами ентероколітів, що викликані РВІ, є виражений ендотоксикоз, стійка лихоманка, блювота, рясні втрати із ступом рідини і електролітів. Характер випорожнень в перші години захворювання часто порівнюють із таким при холері. Інтенсивність втрат електролітів обумовлює розвиток тяжкого ексікозу у дітей раннього віку, що часто призводить до його грізного ускладнення — гіповолемічного шоку [3].