

ТВЕРДОФАЗНЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

© 2009 г. **И. М. Белоусова***, доктор физ.-мат. наук; **О. Б. Данилов***, доктор физ.-мат. наук;
Т. Д. Муравьева*, канд. хим. наук; **И. М. Кисляков***, канд. физ.-мат. наук;
В. В. Рыльков*, канд. физ.-мат. наук; **Т. К. Крисько***;
О. И. Киселев**, академик РАМН, доктор биол. наук;
В. В. Зарубаев**, канд. биол. наук; **А. К. Сироткин****, канд. биол. наук;
Л. Б. Пиотровский***, доктор биол. наук;

* Институт лазерной физики НПК “Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова”, Санкт-Петербург

** ГУ НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург

*** ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

E-mail: Krisko_tata@mail.ru

Предложен и создан новый тип твердофазного фотосенсибилизатора на основе агрегированного фуллерена C₆₀ для фотодинамической инактивации патогенов в биологических жидкостях. В работе показано главное преимущество таких твердофазных систем, которое заключается в сочетании эффективной инактивации патогенов (на примере вирусов гриппа) активными формами кислорода, образуемыми при облучении фотосенсибилизатора в водных и биологических средах, с высокой фотостабильностью фуллереновых покрытий и возможностью полного извлечения фотосенсибилизатора из биологической среды после фотодинамического воздействия.

Коды OCIS: 170.0170.

Поступила в редакцию: 24.11.2008.

Введение

Настоящая статья представляет собой обзор результатов работы по созданию твердофазного фотосенсибилизатора на основе фуллерена C₆₀ для фотодинамической инактивации вирусов в биологической жидкости, выполненной коллективом Института лазерной физики НПК “ГОИ им. С.И. Вавилова” и НИИ гриппа РАМН как в рамках Проекта МНТЦ 2592, так и в ходе дальнейшего развития этих исследований.

В настоящее время актуальной проблемой является инактивация различных патогенов (вирусов, бактерий, простейших и т.д.) в биологических жидкостях, в первую очередь в донорской крови и различных препаратах крови [1]. Действительно, передача инфекций при переливании плазмы донорской крови и использовании лечебных препаратов, полученных из нее, является, к сожалению, одним из путей заражения пациентов гепатитами, ВИЧ и другими особо опасными инфекциями [2]. 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 [3].

Поэтому стратегической задачей службы крови всех стран мира является обеспечение минимального уровня риска передачи гемотрансмиссивных инфекций при введении реципиентам донорской плазмы и препаратов из нее. В связи с этим в службе крови по регламенту Всемирной организации здравоохранения был введен ряд новых инактивационных технологий, позволяющих снизить риск заражения инфекционными заболеваниями при трансфузии и терапии.

К наиболее перспективным инактивационным технологиям относится фотодинамическое воздействие, заключающееся в инактивации инфекционных агентов активными формами кислорода (в том числе синглетным кислородом), образующихся при активации светом вводимого в плазму фотосенсибилизатора.

В качестве фотосенсибилизаторов в настоящее время используются водорастворимые красители, в основном метиленовый синий [1]. Следует отметить, что данная технология реализуется в установках импортного производства, однако

в России технология фотодинамической инактивации крови и ее препаратов практически не используется.

Несмотря на высокую эффективность, существующий фотодинамический метод имеет существенные недостатки, которые заключаются в необходимости последующего удаления красителя из инактивированной плазмы, что реализуется с помощью специально разработанных селективных фильтров только в небольших объемах плазмы [1]. К тому же данный метод не может быть применен для инактивации пулированной плазмы для производства лечебных белковых препаратов из-за невозможности полного удаления красителя и продуктов его фотодеградации из больших объемов вязкой биологической жидкости.

В настоящей работе предложена новая идеология создания на основе фуллеренов твердофазных фотосенсибилизаторов, способных в различных средах преобразовывать триплетный кислород в синглетный. При этом твердофазные фотосенсибилизаторы сохраняют свою фотостабильность и могут быть легко отделены от биологических жидкостей после фотовоздействия.

Создание нового класса высокоэффективных твердофазных фотосенсибилизаторов может позволить осуществлять инактивацию биологических жидкостей в гетерогенных условиях, что обеспечит простоту полного извлечения реагента после процесса инактивации и, тем самым, будет гарантировать отсутствие нежелательных примесей в целевом продукте. Такие фотосенсибилизаторы, например, с успехом смогут применяться как в процессах инактивации небольших объемов плазмы из дозы донорской крови, так в случае инактивации пулированной плазмы для получения из нее лечебных препаратов.

Фуллерен и фотодинамическая инактивация вирусов

В основе фотодинамической инактивации вирусов лежат реакции фотосенсибилизированного окисления органических соединений активными формами кислорода: супероксидным анион-радикалом $O_2^{\bullet-}$ и гидроксильным радикалом OH^{\bullet} (механизм I типа) или синглетным кислородом 1O_2 (механизм II типа) [4]. Оба типа фотодинамических реакций протекают одновременно, конкурируя между собой в зависимости от относительной концентрации кислорода, фотоокисляемой молекулы, pH среды и ее состава (наличия электронодонорных соединений) [5, 6].

Так, например, при облучении в водных средах образование долгоживущего триплетного состояния молекулы фуллерена C_{60} (энергетическая схема уровней C_{60} приведена в [7]) способствует генерации только синглетного кислорода при отсутствии в растворе электронодонорных соединений и всех видов активных форм кислорода в присутствии электронодонорных соединений.

Учитывая некоторые их свойства, можно было предположить, что не растворимые в воде молекулы фуллерена C_{60} могут составить конкуренцию традиционно используемым в фотодинамике водорастворимым красителям. К преимуществам таких фотосенсибилизаторов относятся:

- широкий спектр поглощения [7],
- количественный квантовый выход, практически равный 1, синглетного кислорода (для изолированных молекул) [8–10];
- превалирование процесса образования синглетного кислорода молекулярным фуллереном над обратным процессом тушения синглетного кислорода фуллереном. Так, константа образования синглетного кислорода в реакции с фуллереном определяется величиной $k_1(^1O_2) = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [8], в то время как константа тушения синглетного кислорода при взаимодействии с фуллереном составляет только $k_2(^1O_2) = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [8]. Важно отметить, что $k_2(^1O_2)$ для большинства сенсibilизаторов-красителей (например, хлорофилла а, феофитина а, β -каротина) на несколько порядков превосходит эту величину для фуллеренов и составляет 10^8 – $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [11]. Отсюда ясно, что при прочих равных условиях для фотодинамического воздействия молекулы фуллерена могут быть более эффективными, чем традиционные красители;
- низкая токсичность [12],
- высокая фотохимическая стабильность [13],
- простота создания на их основе твердофазных, не растворимых в воде фотосенсибилизаторов.

Ранее было показано, что для создания твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллерена целесообразнее использовать немодифицированный фуллерен C_{60} [6], однако получение твердофазной композиции, содержащей мономеры немодифицированного фуллерена, представляется достаточно сложной задачей, требующей специфического подхода и использования специальных матриц [14–16]. Поэтому важно было определить влияние агрегации молекул C_{60} на энергетическую схему уровней фуллерена и, таким образом, на эффективность генерации активных форм кислорода, приво-

дящих к инактивации патогенов. Проведенный анализ исследований по данной проблеме [17] показал, что агрегация молекул C_{60} способствует изменению структуры энергетических уровней мономера с образованием энергетических зон, а также уровней синглетных и триплетных экситонов Френкеля, являющихся аналогами уровней, отвечающих состояниям S_1 и T_1 изолированной молекулы. Таким образом, принцип генерации активных форм кислорода при агрегации фуллерена сохраняется, однако уменьшаются, например, времена жизни состояний S_1 и T_1 фуллерена, а также вероятность взаимодействия фуллерена и молекулярного кислорода.

Экспериментальное подтверждение уменьшения эффективности генерации активных форм кислорода при агрегации молекул фуллерена было показано в ряде работ [18–21], однако очевидно, что для каждого конкретного вида агрегатов фуллерена необходимо отдельно решать вопрос об эффективности тушения энергетических состояний в кластере, поскольку она зависит от степени агрегации, упорядоченности и силы взаимодействия фуллеренов в агрегате.

Кроме того, эффективность технологического процесса инактивации патогенов в биологической жидкости твердофазными фотосенсибилизаторами на основе агрегированного фуллерена определяется не только их фотосенсибилизирующей способностью, но также избирательностью воздействия на патогены и относительно высокой фотостабильностью. Помимо этого, при работе с биологической жидкостью следует учитывать большую вязкость среды и влияние ее биологических компонентов на ход процесса инактивации. Перспектива применения твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллерена C_{60} для инактивации патогенов (в том числе вирусов) в биологических жидкостях (например, в плазме крови) приводит к необходимости изучения всех вышеупомянутых факторов.

Были сформулированы основные требования, которыми должен обладать твердофазный фуллеренсодержащий фотосенсибилизатор, пригодный к использованию в процессе очистки биологических жидкостей (в первую очередь плазмы и препаратов плазмы крови) от патогенов (в первую очередь вирусов):

- простота получения и воспроизводимость физико-химических свойств,
- возможность сохранения высокой эффективности генерации активных форм кислорода фуллереном в гетерогенных условиях,

- химическая и физическая устойчивость под действием излучения видимого диапазона спектра с плотностью мощности 100 мВт/см^2 в водных средах,

- хорошая смачиваемость водными средами,
- полная извлекаемость фотосенсибилизаторов из биологической среды после процедуры фотодинамического воздействия,

- технологичность их практического использования в процессах инактивации патогенов (в первую очередь вирусов),

- высокая способность к инактивации патогенов в биологических жидкостях, обладающих высокой вязкостью.

Твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов

Для выполнения вышеприведенных требований к твердофазным фуллеренсодержащим фотосенсибилизаторам были предложены, изготовлены и исследованы

- 1) раздробленный фуллерит и его водная суспензия,

- 2) “аморфный” фуллерен и его водная суспензия,

- 3) пластины с нанесенным на них слоем фуллерена,

- 4) микрочастицы силикагеля с нанесенным на них слоем фуллерена и их водная суспензия.

Для исследования структуры этих твердофазных фотосенсибилизаторов были использованы рентгеноструктурный анализ, элементный анализ, электронная микроскопия, динамическое светорассеяние. Для качественного определения степени агрегации фуллерена применялся спектральный анализ [22].

Спектры поглощения C_{60} полученных твердофазных фотосенсибилизаторов представлены на рис. 1 и характерны для высоко агрегированной формы фуллерена [22]. В этом случае, в отличие от спектра раствора C_{60} , происходят уширение полос поглощения, уменьшение их амплитуды и сдвиг максимумов в сторону больших длин волн, а также появление широкой полосы поглощения в области 450 нм, сопровождающееся исчезновением острого пика мономера C_{60} в области 405–407 нм.

Суспензия раздробленного кристаллического фуллерена, получаемая в процессе обработки суспензии кристаллического фуллерена ультразвуком и ранее успешно применявшаяся для фотодинамической инактивации вирусов в водном растворе солей [12, 13], явилась для

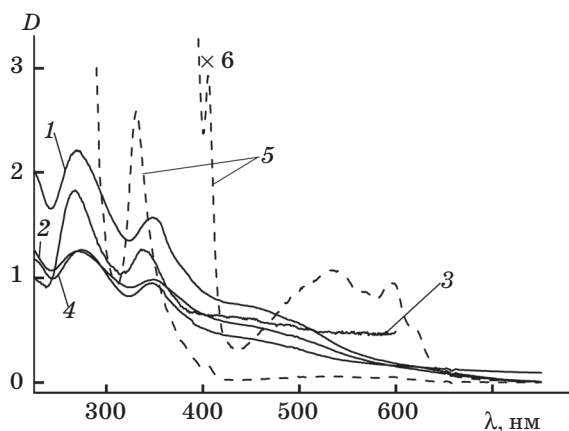


Рис.1. Спектры поглощения фуллерена C_{60} в твердофазных фуллеренсодержащих системах. 1 – суспензия “аморфного” фуллерена, 2 – суспензия раздробленного кристаллического фуллерена, 3 – микрочастицы силикагеля, покрытые фуллереном, 4 – вакуумное напыление на кварце, $L = 77,5$ нм; 5 – раствор C_{60} в CCl_4 .

нас отправной точкой в создании твердофазных фуллеренсодержащих фотосенсибилизаторов. Действительно, она характеризуется исключительной простотой получения, однако, как оказалось, обладает большой неоднородностью частиц по размеру, а процесс ее получения характеризуется невоспроизводимостью [17].

В связи с этим был предложен способ получения суспензии фуллерена в воде, характеризующийся воспроизводимым узким распределением частиц по размеру. В качестве первой стадии процесса был взят способ получения водного мицеллярного раствора фуллерена по методу Г.В. Андриевского [23]. Затем были оптимизированы условия получения устойчивого мицеллярного раствора фуллерена в воде, а также разработаны и предложены современные и более информативные условия изучения таких растворов методом электронной микроскопии [24].

Принимая во внимание тот факт, что процессы инактивации вирусов происходят в среде, содержащей определенное количество неорганических солей, было изучено поведение и свойства мицеллярного раствора фуллерена при добавлении в водный раствор физиологического количества хлористого натрия (0,9%). В результате такой модификации гидратная оболочка мицелл разрушается и мицеллярный раствор превращается в суспензию относительно однородных по размеру частиц фуллерена. Методом электронной микроскопии было показано, что

средний размер таких частиц составляет приблизительно 20–30 нм.

Структуры лиофильно высушенных частиц такой водной суспензии C_{60} и частиц водной суспензии раздробленного кристаллического фуллерена были изучены рентгенографическим методом (рис. 2). На рентгенограммах вместе с пиками, характеризующими кристаллический фуллерен, четко видны гало, которые могут трактоваться как характеристика аморфной составляющей полученных порошков. Таким образом, методом модификации водного мицеллярного раствора C_{60} получена дисперсная фуллереновая композиция, представляющая собой аморфный фуллерен (67%) с примесью кристаллического фуллерена (33%), а методом ультразвуковой обработки суспензии кристаллического фуллерена – композиция, содержащая 60% кристаллического фуллерена и 40% аморфного.

Однако оказалось, что ни суспензия раздробленного кристаллического фуллерена, ни суспензия условно названного “аморфным” фуллерена не могут обеспечить достаточную технологичность их практического использования в процессах инактивации вирусов. Такие мелкие частицы трудно отделять от вязкой биологической среды, и, кроме того, в ходе эксперимента инактивационная активность снижалась, вероятно, вследствие укрупнения мелких частиц фотосенсибилизатора при взаимодействии их с белками (см. ниже).

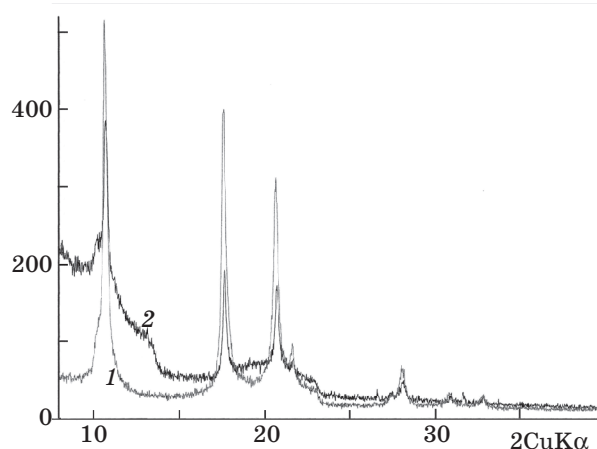


Рис. 2. Рентгенограммы лиофильно высушенных частиц суспензии раздробленного кристаллического фуллерена (1) и модифицированного водного мицеллярного раствора фуллерена (2).

С целью устранения указанных недостатков были разработаны композиционные твердофазные фотосенсибилизаторы, представляющие собой фуллереновые покрытия на различного вида матрицах. Однако при использовании пластин с покрытием фуллерена в биологических экспериментах наблюдалась их невысокая эффективность, что, по всей видимости, может объясняться малой рабочей площадью фуллереносодержащей поверхности.

С целью увеличения рабочей площади поверхности твердофазных сенсбилизаторов авторами работы был предложен и разработан способ нанесения покрытия из фуллерена на частицы силикагеля. В качестве матрицы был выбран микропористый силикагель марки КСК отечественного производства. Методом элементного анализа на содержание углерода было установлено, что покрытие из фуллерена на частицах силикагеля составляет в среднем 3–4 вес.% к весу всей композиции [17].

Результаты экспериментов показали, что эта фуллереносодержащая композиция с покрытой фуллереном поверхностью наилучшим образом соответствует сформулированным характеристикам оптимального фотосенсибилизатора по совокупности параметров хорошей смачиваемости водными средами, простоты получения и воспроизводимости физико-химических свойств.

Генерация синглетного кислорода твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллерена

Генерация активных форм кислорода, и в том числе синглетного кислорода, агрегированным фуллереном под воздействием облучения, по-видимому, определяется образованием синглетных и триплетных экситонов Френкеля [21]. При этом свободные синглетные и триплетные экситоны Френкеля способны быстро мигрировать по бездефектным участкам молекулярного кристалла фуллерена и при столкновении эффективно аннигилировать, практически не внося, таким образом, вклад в образование активных форм кислорода. В то же время наличие дефектов в кристаллической решетке агрегированного фуллерена способствует локализации экситонов Френкеля и, таким образом, значительному продлению их времени жизни, которое несущественно отличается от такового для изолированной молекулы фуллерена [21].

Следовательно, процесс генерации активных форм кислорода при облучении агрегированного

фуллерена будет тем эффективнее, чем больше количество поверхностных дефектов твердофазного покрытия, т. е. чем больше эффективная концентрация C_{60} (концентрация молекул фуллерена, непосредственно участвующих в процессе передачи энергии или электрона молекулярному кислороду [25]).

Все изготовленные твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов были исследованы на генерацию активных форм кислорода в водных средах, не содержащих электронодонорных соединений. В таких средах из двух конкурирующих реакций типов I и II абсолютным преимуществом обладает реакция образования синглетного кислорода [6].

Образование синглетного кислорода при облучении твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллерена в водной среде регистрировалось двумя методами [25]: по наблюдению люминесценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм и по наблюдению уменьшения оптической плотности индикаторного соединения, пропорциональной наработке синглетного кислорода (фотохимический метод количественного определения 1O_2 в водных средах).

Прежде всего по наблюдению люминесценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм (схема установки, параметры эксперимента и основные временные зависимости люминесценции 1O_2 приведены в [25]) было показано образование синглетного кислорода в суспензиях фуллереносодержащих микрочастиц (“аморфный” фуллерен, раздробленный кристаллический фуллерен и микрочастицы, покрытые фуллереном) и на покрытой фуллереном поверхности стеклянной/кварцевой подложки, а также измерены времена жизни синглетного кислорода в биологических средах. Кроме того, было показано, что интенсивность люминесценции 1O_2 прямо пропорциональна интенсивности возбуждающего импульса и возрастает с увеличением концентрации фуллерена.

Однако оказалось, что определению количества образуемого кислорода люминесцентным методом мешают многочисленные систематические ошибки, поэтому было предложено обратиться к одному из высокочувствительных фотохимических методов количественного определения 1O_2 в водных средах [26]. В качестве “ловушки” синглетного кислорода в этом методе выступает аминокислота – гистидин, в качестве индикатора синглетного кислорода – п-нитрозодиметиланилин (RNO), характеризующийся интенсивной полосой поглощения

с максимумом $\lambda_m = 440$ нм и полушириной $\Delta\lambda_{1/2}(\text{FWHM}) = 75$ нм. При реакциях, протекающих по такой схеме, падение оптической плотности раствора, регистрируемой на длине волны 440 нм, $\Delta D(440) < 0$, должно быть прямо пропорционально увеличению концентрации синглетного кислорода, наработанного за время наблюдения.

Поскольку данный метод первоначально был разработан для растворов, то для применения к твердофазным сенсбилизаторам он был модифицирован с учетом некоторых дополнительных факторов: возможной сорбции молекул RNO на твердофазном образце, его нагрева в процессе облучения и связанной с ним термодесорбции RNO обратно в раствор, оседания образца в процессе облучения [27].

Экспериментальные данные зависимости стационарной концентрации синглетного кислорода, приведенной к плотности мощности $I = 100$ мВт/см², от эффективной концентрации фуллерена представлены в таблице. Данные соответствуют изученным фуллеренсодержащим образцам. Для облегчения сравнения сенсбилизующих свойств исследуемых композиций была введена удельная величина [¹O₂], которая представляет собой отношение стационарной концентрации синглетного кислорода к средней концентрации фотосенсбилизатора в растворе.

Для оценки максимальных возможностей фуллерена как генератора синглетного кислорода в водной среде было рассчитано теоретическое значение концентрации [¹O₂], образуемой мономером фуллерена в воде [25]. Учитывая

нерастворимость C₆₀ в воде, такая идеальная ситуация была нами названа псевдораствором фуллерена.

Анализ полученных данных позволил [17, 25]

- подтвердить факт генерации синглетного кислорода всеми разработанными нами твердофазными фотосенсбилизаторами на основе C₆₀, впервые зафиксированный люминесцентным методом;
- подтвердить справедливость использования выбранных и разработанных методик и подходов к изучению сенсбилизующей способности твердофазных фотосенсбилизаторов на основе фуллеренов;
- подтвердить наличие зависимости концентрации образованного синглетного кислорода от концентрации фуллерена в системе;
- подтвердить факт ухудшения сенсбилизующих свойств фуллерена при агрегации и впервые количественно оценить стационарную концентрацию синглетного кислорода, вырабатываемую фуллеренсодержащими твердофазными фотосенсбилизаторами в водной среде;
- подтвердить факт взаимосвязи между способностью агрегированного фуллерена к генерации синглетного кислорода и образованием поверхностных локализованных экситонов в областях разупорядоченности его кристаллической структуры;
- установить, что оптимальная толщина слоя агрегированного фуллерена, обеспечивающая эффективное возбуждение молекул сенсбилизатора и генерацию синглетного кислорода, отвечает диапазону 20–300 нм вне зависимости от формы агрегата (слой или частица).

Результаты измерений стационарной концентрации синглетного кислорода [¹O₂], фотосенсбилизированного в водной среде исследуемыми системами, при $I = 100$ мВт/см².

Фотосенсбилизатор	Концентрация		
	Средняя, см ⁻³ ×10 ¹⁶	Стационарная [¹ O ₂], см ⁻³ ×10 ⁸	Удельная [¹ O ₂], ×10 ⁸
Теоретическое значение для мономера C ₆₀	8,40	1200,0	142,86
Раздробленные кристаллы C ₆₀	2,50	1,9	0,76
Частицы “аморфного” C ₆₀	12,00	12,0	1,00
Микрочастицы силикагеля с C ₆₀	8,40	9,5	1,13
Вакуумное напыление C ₆₀ на кварцевой пластинке,			
L = 5 нм	0,09	0,0	—
L = 77,5 нм	1,70	1,5	0,88
L = 1350 нм	25,00	15,0	0,60

Фотостабильность твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов

Высокая фотохимическая стабильность самих молекул фуллерена C_{60} хорошо известна [13], поэтому можно сосредоточить внимание только на фотостабильности фуллереновых покрытий, тем более что они намного более перспективны для применения в фотодинамической инактивации патогенов в биологических жидкостях, чем суспензии фуллереновых частиц. В связи с этим была изучена фотостабильность покрытий фуллерена на стеклянных пластинах и микрочастицах силикагеля по сравнению с эталонным фотосенсибилизатором (метиленовым синим) [28]. Для выяснения возможных механизмов убыли фуллерена при облучении твердофазные покрытия были исследованы как в водной среде, так и на воздухе.

Фотостабильность определялась по изменению свойств фотосенсибилизаторов – спектров поглощения, эффективности генерации синглетного кислорода и электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) в результате облучения. Интенсивность, спектральный состав и максимальная длительность облучения были выбраны из условия соответствия параметрам облучения, применявшимся при экспериментальном моделировании реального технологического процесса инактивации вирусов твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллеренов [29].

Анализ полученных результатов показал, что при длительном (2–3 часа) облучении интенсивным (100 мВт/см^2) источником видимого диапазона фуллереновые покрытия в воде более фотостабильны, чем раствор метиленового синего. Об этом свидетельствуют как данные измерения спектров поглощения, так и результаты регистрации эффективности образования синглетного кислорода (рис. 3). Кроме того, наблюдается корреляция хода зависимости изменения спектра поглощения при облучении с ходом зависимости снижения сенсibiliзирующей способности при тех же условиях для каждого из фотосенсибилизаторов. При этом очевидно, что фотодеградация фуллеренового покрытия происходит только в приповерхностном слое, что в данном случае является причиной невозможности соответствия абсолютных значений указанных параметров. Так, изменение эффективности генерации синглетного кислорода фуллереном, нанесенным на микрочастицы силикагеля, составляет примерно 30% за 2 часа, а изменение

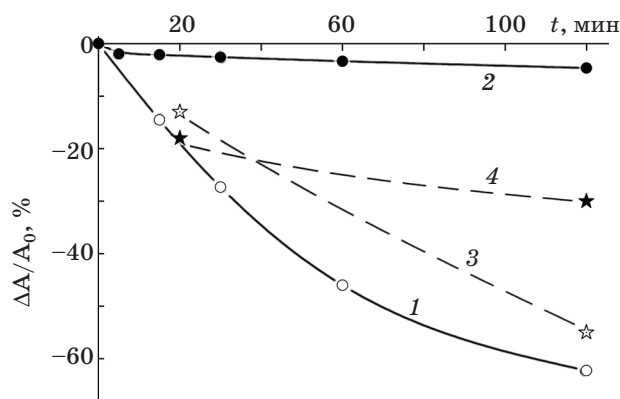


Рис. 3. Относительное изменение концентрации фотосенсибилизаторов (1, 2) и их фотосенсибилизирующих свойств (3, 4) в зависимости от времени облучения; 2, 4 – суспензия микрочастиц силикагеля с фуллереновым покрытием, 1, 3 – раствор метиленового синего.

убыли фуллерена, наблюдаемой по спектру, – примерно 5% за 2 часа.

Несмотря на то что фотостабильность фуллереновых покрытий, как оказалось, не зависит от среды, механизмы убыли фуллерена в составе покрытий на воздухе и в воде различны: предположительный преобладающий механизм убыли фуллерена на воздухе – окисление, в воде – фотополимеризация [28].

Следовательно, высокая фотостабильность покрытий фуллерена C_{60} как в водной, так и в газовой среде обуславливает перспективность их применения в фотодинамической терапии.

Фотодинамическая инактивирующая способность твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов

Важным преимуществом метода фотодинамической инактивации вирусов в плазме и препаратах плазмы крови является преимущественное воздействие на патогены, а не на белковую среду, за счет тропности сенсibiliзатора к вирусу. Предлагая фуллерен в качестве фотосенсибилизатора в этом процессе, мы учитывали его тропность к липидным мембранам, составляющим оболочку вируса или клетки [5, 6]. Эта тропность должна обеспечить контакт фотосенсибилизатора с патогеном, что в свою очередь (при облучении фотосенсибилизатора) будет способствовать разрушению инфекционного агента активным кислородом.

Действительно, было показано фотодинамическое противовирусное действие незамещенного фуллерена C_{60} в виде водной суспензии в отношении некоторых оболочечных вирусов и одного безоболочечного вируса (парвовирус мышей) [12, 13, 28, 30, 31]. В качестве фотосенсибилизаторов в этих работах применялись суспензия раздробленного кристаллического фуллерена и суспензия “аморфного” фуллерена, в качестве модельных водных сред – растворы неорганических солей и реальная биологическая жидкость – аллантоисная жидкость куриных эмбрионов (стандартная среда для вирусологических исследований [32]).

Однако оказалось, что в случае вязкой биологической жидкости фотодинамическое действие фуллерена в обоих видах твердофазных композиций через 1–2 часа прекращалось. Прекращение процесса инактивации вирусов было связано с образованием конгломератов, окрашенных фуллереном в черный цвет. Обычно их размеры к концу эксперимента составляли около 0,1–0,3 мм и более. По данным электронной микроскопии, эти частицы содержат агрегаты белков и других компонентов аллантоисной жидкости [29, 31]. Учитывая, что в контрольных экспериментах без освещения указанных конгломератов не образовывалось, их появление имеет фотохимическую природу.

Для изучения инактивирующей способности фуллереносодержащих покрытий было проведено экспериментальное моделирование реального технологического процесса и была определена динамика фотодинамической инактивации оболочечных вирусов в модельных водных системах. Методика эксперимента была аналогична описанной в [29]. В качестве модельного оболочечного вируса в этих экспериментах применялся вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1), в качестве модельных водных систем – физиологический раствор и аллантоисная жидкость куриных эмбрионов.

Прежде всего было показано, что подложки (пластины или частицы), не обработанные фуллереном, практически не оказывают инактивирующего влияния на вирусы гриппа ни в световых условиях, ни в отсутствие освещения. Это было справедливо и для всех подложек, покрытых фуллереном, но не подвергавшихся облучению (см. кривую 1 на рис. 4). Экспериментальная ошибка определения титра вируса в этих и всех последующих опытах составляла одну единицу инфекционного титра вируса.

На рис. 4 также представлены типичные результаты фотодинамической инактивации

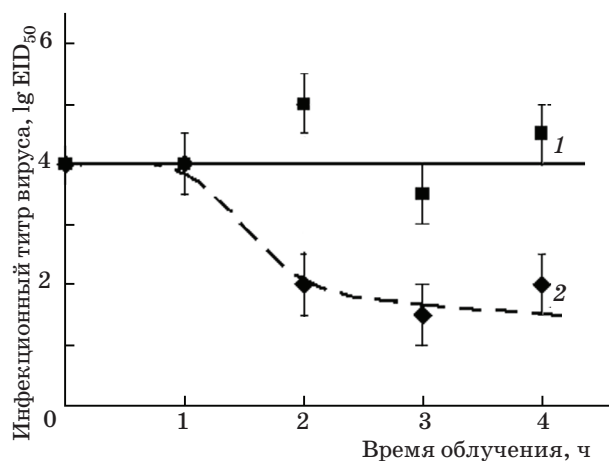


Рис.4. Кинетика фотодинамической инактивации вируса гриппа в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов с использованием стеклянной пластины с фуллереном, нанесенным с полистирольным компаундом. 1 – в темноте, 2 – при освещении.

вируса гриппа фуллереносодержащей пластиной. Здесь следует отметить, что для всех исследованных фуллереносодержащих пластин эффективность фотохимической инактивации вируса гриппа была примерно одинакова (снижение титра вируса на 2–2,5 порядка). Так же, как в случаях с суспензиями раздробленного кристаллического и “аморфного” фуллерена, здесь наблюдается расход активной части фотосенсибилизатора, что проявляется в прекращении инактивации вируса примерно после второго часа облучения. В этих условиях степень фотоинактивации определяется соотношением площади поверхности пластин (19,6 см²) и объема биологической жидкости (30 мл). При изменении этого соотношения степень фотоинактивации может быть существенно увеличена.

Использование подложки с большой удельной поверхностью (микрочастицы) значительно увеличивает эффективность инактивации вирусов и, по предварительным данным, заметно уменьшает влияние потери фотосенсибилизатором инактивирующей способности (рис. 5).

Для твердофазного фотосенсибилизатора, представляющего собой микрочастицы силикагеля, покрытые фуллереном, также было проведено определение оптимальных значений удельной освещенности и концентрации фуллерена, обеспечивающих условия полной инактивации вирусов гриппа в аллантоисной жидкости при сохранении структуры белков [31]. Удельная освещенность реакционной смеси оценивалась

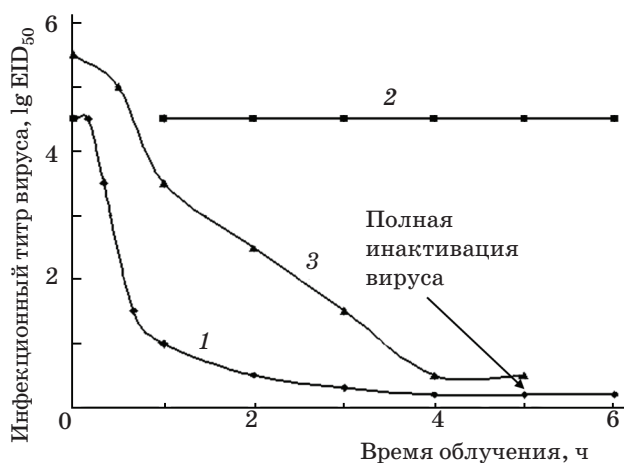


Рис.5. Инактивация вируса гриппа в условиях, приводящих к полной потере инфекционности. Фотосенсибилизатор – фуллерен, нанесенный на частицы силикагеля. Биологическая среда – аллантоисная жидкость. 1 – концентрация фуллерена 2,7 мг/мл, удельная освещенность – 85 мВт/см³; 2 – концентрация фуллерена 2,7 мг/мл, без освещения; 3 – концентрация фуллерена 2,16 мг/мл, удельная освещенность – 68 мВт/см³.

как мощность освещения, приходящаяся на 1 см³ раствора, что является относительным приближением, введенным нами для сравнительной оценки эффективности освещения объема реакционной смеси. При этом исходная мощность освещения была одинакова, менялся лишь объем реакционной смеси. Контроль нативности белков, а также обнаружение их деструкции и агрегации в олиго- и полиглобулярные комплексы, осуществлялись методом электрофореза, который позволяет проводить разделение белковой смеси и оценивать молекулярный вес и относительное количество каждой из фракций.

На рис. 5 представлены кинетические кривые, отражающие характер протекания процессов инактивации вируса гриппа. Полное отсутствие инфекционности подтверждалось также контролем остаточной инфекционности в пробе, взятой из реакционной смеси после окончания процесса инактивации. Для этого пробой из реакционной смеси инфицировали (10–12)-дневный куриный эмбрион и инкубировали в течение 2 суток в термостате при 37 °С. Затем эмбрион вскрывали и определяли титр вируса в аллантоисной жидкости по стандартной методике [29]. Результаты анализа свидетельствовали о полном отсутствии инфекционной активности вируса в этом случае. Косвенным доказательством также

являлось изучение морфологии вируса методом электронной микроскопии, который практически не зафиксировал наличие в пробе неразрушенных вирусных частиц.

Результаты проведенных экспериментов показали зависимость кинетики процессов инактивации оболочечных вирусов (гриппа) от концентраций фуллерена и кислорода, а также дозы освещения, что является прямым доказательством фотодинамической природы процесса деструкции вирионов гриппа.

Заключение

Разработаны фотостабильные твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллерена для генерации активных форм кислорода в водных, в том числе биологических, средах. Главное преимущество таких твердофазных систем – возможность полного извлечения фотосенсибилизатора из биологической среды после фотодинамического воздействия.

Разработана высокочувствительная фотохимическая методика обнаружения синглетного кислорода, применимая для изучения сенсibiliзирующей способности различных твердофазных фотосенсибилизаторов ¹O₂ в водных средах.

Впервые экспериментально доказана и исследована генерация синглетного кислорода агрегированным фуллереном C₆₀ в составе твердофазных фотосенсибилизаторов в водной среде.

В ходе биологических экспериментов показано, что твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов способны эффективно инактивировать оболочечные вирусы активными формами кислорода как в водной среде, так и в вязкой биологической жидкости.

Таким образом, создан новый тип твердофазного фотосенсибилизатора для фотодинамической инактивации патогенов в биологических жидкостях, который, в том числе, может быть использован в разработке первой отечественной технологии получения патогеннобезопасной плазмы донорской крови и препаратов из нее.

Постановка работы и руководство биологическими исследованиями в проекте МНТЦ № 2592 по инактивации вирусов в биологических жидкостях осуществлялись академиком РАМН О.И. Киселевым и профессором Л.Б. Пиотровским.

Авторы работы выражают благодарность всем сотрудникам ИЛФ НПК “ГОИ им. С.И. Вавило-

ва”, ГУ НИИ гриппа РАМН и ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, принимавшим участие в выполнении данной работы.

Работа выполнена при поддержке гранта МНТЦ № 2592, Комитета экономического развития, промышленной политики и торговли Правительства Санкт-Петербурга (ГОСК № 251-07/ОГЗ) и РФФИ (Грант № 08-03-00496-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Мор Х., Ламбрехт Б. Способ инактивации вирусов в крови и ее компонентах // Патент России № 2036235. 1992.
2. Barbara J. Why “Safer than Ever” May not be Quite Safe Enough // Transfusion Medicine and Hemotherapy. 2004. V. 31. P. 2–10.
3. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н., Воробей Л.Г., Григорья М.Ш. Служба крови России в 2005 году // Трансфузиология. 2006. Т. 7. № 3. С. 4–43.
4. Foote C.S. Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems // Free Radicals in Biology / Ed. by Pryor W.A. New York: Academic Press, 1976. V. 2. P. 85–133.
5. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии // Сев.-Зап. отд. РАМН. СПб.: ООО Издательство “Росток”, 2006. 336 с.
6. Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A., Arakane K., Miyata N., Goda Y., Masumizu T., Nagano T. Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene (C₆₀) as Potential Medicines: O^{•-} versus ¹O₂ // J. of the Amer. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 12803–12809.
7. Пиотровский Л.Б., Белоусова И.М., Данилов О.Б., Киселев О.И. Фуллерены: фотодинамические процессы и новые подходы в медицине. СПб.: Роза мира, 2005. 139 с.
8. Arbogast J.W., Darmany A.P., Foote C.S., Diederich F.N., Rubin Y., Diederich F., Alvarez M.M., Anz S.J. Photophysical Properties of Sixty Atom Carbon Molecule (C₆₀) // J. of Physical Chemistry. 1991. V. 95. P. 11–12.
9. Arbogast Y.W., Foote Ch.S. Photophysical Properties of C₆₀ // J. of the Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 8886–8889.
10. Nagano T., Arakane K., Ryu A., Masunaga T., Shin-moto K., Mashiko S., Hirobe M. Comparison of Singlet Oxygen Production Efficiency of C₆₀ with Other Photosensitizers, Based on 1268 nm Emission // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1994. V. 42. № 11. P. 2291–2294.
11. Krasnovsky A.A., Jr. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies // Membrane Cellular Biology. 1998. V. 12. № 5. P. 665–690.
12. Kasermann F., Kempf C. Photodynamic Inactivation of Enveloped Viruses by Buckminsterfullerene // Antiviral Research. 1997. V. 34. P. 65–70.
13. Kasermann F., Kempf C. Buckminsterfullerene and Photodynamic Inactivation of Viruses // Rev. in Med. Virology. 1998. V. 8. P. 143–151.
14. Schulz-Ekloff G., Wöhrle D., van Duffel B., Schonheydt R.A. Chromophores in porous silicas and minerals: preparation and optical properties // Microporous and Mesoporous Materials. 2002. V. 51. P. 91–138.
15. Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Bergoy E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.J., Prasad P.N. Ceramic-based Nanoparticles Entrapping Water-insoluble Photosensitizing Anticancer Drugs: a Novel Drug-carrier System for Photodynamic Therapy // J. of the Amer. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 7860–7865.
16. Subbiah S., Mokaya R. Transparent thin films and monoliths synthesized from fullerene doped mesoporous silica: evidence for embedded monodispersed C₆₀ // Chem. commun. 2003. V. 1. P. 92–93.
17. Белоусова И. М., Белоусов В.П., Киселев В.М., Муравьева Т.Д., Кисляков И.М., Сироткин А.К., Стародубцев А.М., Крисько Т.К., Багров И.В., Ермаков А.В. Структурные и оптические свойства твердофазных фотосенсибилизаторов синглетного кислорода на основе водных суспензий фуллерена // Опт. и спектр. 2008. Т. 105. № 5. С. 777–786.
18. Beeby A., Eastoe J., Heenan R.K. Solubilisation of C₆₀ in Aqueous Micellar Solution // J. of the Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. V. 10. P. 173–175.
19. Konstantaki M., Koudoumas E., Couris S., Janot J.M., Eddaoudi H., Deratani A., Seta P., Leach S. Optical Limiting Behavior of the Water-Soluble C₆₀/γ-cyclodextrin Complex // Chem. Phys. Lett. 2000. V. 318. P. 488–495.
20. Quaranta A., McGarvey D.J., Land E.J., Brettreich M., Burghardt S., Schönberger H., Hirsch A., Gharbi N., Moussa F., Leach S., Götinger H., Bensasson R.V. Photophysical Properties of a Dendritic Methano[60]fullerene Octadeca Acid and Its tert-butyl Ester: Evidence for Aggregation of the Acid Form in Water // Phys. Chem., Chem. Phys. 2003. V. 5. P. 843–848.
21. Fujitsuka M., Kasai H., Masuhara A., Okada S., Oikawa H., Nakanishi H., Ito O., Yase K. Laser Flash Photolysis Study on Photophysical and Photochemical Properties of C₆₀ Fine Particles // Journal of Photochemistry and Photobiol. A: Chemistry. 2000. V. 133. P. 45–50.
22. Bensasson R.V., Bienvenue E., Dellinger M., Leach S., Seta P. C₆₀ in Model Biological Systems. A visible-UV Absorption Study of Solvent-dependent Parameters and Solute Aggregation // J. of Phys. Chem. 1994. V. 98. P. 3492–3500.
23. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. On the Production of

- an Aqueous Colloidal Solution of Fullerenes // J. of the Chem. Soc., Chem. Commun. 1995. V. 12. P. 1281–1282.
24. Белоусов В.П., Белоусова И.М., Крисько А.В., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д., Сироткин А.К. Водный мицеллярный раствор C_{60} : получение, некоторые свойства и способность к генерации синглетного кислорода // Ж. общ. химии. 2006. Т. 76. № 2. С. 265–272.
25. Belousova I.M., Danilov O.B., Kiselev V.M., Kislyakov I.M., Kris'ko T.K., Murav'eva T.D., Videnichev D.A. Solid-phase Fullerene-like Nanostructures as Singlet Oxygen Photosensitizers in Liquid Media // Proc. SPIE. 2007. V. 6613. P. 66130C-1–66130C-12.
26. Kraljic I., Mohsni S.Et. A New Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solutions // Photochem. and Photobiol. 1978. V. 28. P. 577–581.
27. Крисько Т.К., Кисляков И.М. Фотохимический метод регистрации синглетного кислорода в водной среде для изучения фотосенсибилизирующей способности твердофазных композиций // Оптический журнал. 2009. Т. 76. № 6.
28. Багров И.В., Белоусова И.М., Ермаков А.В., Киселев В.М., Кисляков И.М., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д. Фотостабильность покрытия фуллерена C_{60} как твердофазного фотосенсибилизатора синглетного кислорода // Опт. и спектр. 2008. Т. 105. № 5. С. 787–793.
29. Zarubaev V.V., Belousova I.M., Kiselev O.I., Piotrovsky L.B., Anfimov P.M., Krisko T.C., Muraviova T.D., Rylkov V.V., Starodubcev A.M., Sirotkin A.C. Photodynamic Inactivation of Influenza Virus with Fullerene C_{60} Suspension in Allantoic Fluid // Photodiagnosis and Photodynamic therapy. 2007. V. 4. P. 31–35.
30. Sirotkin A.K., Zarubaev V.V., Poznyakova L.N., Dumpis M.A., Muravieva T.D., Krisko T.K., Belousova I.M., Kiselev O.I., Piotrovsky L.B. Pristine Fullerene C_{60} : Different Water Soluble Forms – Different Mechanisms of Biological Action // Fullerene, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2006. V. 14. № 2–3. P. 327–333.
31. Zarubaev V.V., Kiselev O., Belousova I., Rylkov V., Slita A., Sirotkin A., Anfimov P., Muraviova T., Starodubtsev A. Photodynamic Inactivation of Enveloped Viruses by Fullerene: Study of Efficacy and Safety // Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes (Series: Carbon Materials: Chemistry and Physics) / Ed. by Cataldo F., Da Ros T. Netherlands: Springer, 2008. 408 p. P. 107–121.
32. Mahy B.W. J Virology – a Practical Approach // Washington DC: IRL Oxford Press, 1985. 264 p.
-