

УДК 535.4, 681.7

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ UVA ИЗЛУЧЕНИЯ НА ИНФЕКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА КОРОНАВИРУСА

И. Н. Завестовская^{1,2}, В. А. Гуцин³, М. А. Никифорова³, А. Э. Синявин³,
Л. И. Руссу³, Е. А. Чешев¹, А. Л. Коромыслов¹, И. М. Тупицын¹,
А. А. Фроня^{1,2}, М. С. Григорьева^{1,2}

Представлены результаты экспериментальных исследований воздействия ультрафиолетового излучения в диапазоне длин волн UVA, безопасном для человека, на инфицирующие свойства β -коронавируса. Для исследований был выбран бычий коронавирус как прототип возбудителя COVID-19, (SARS-CoV-2), но не являющийся патогенным для человека. В качестве источника излучения были использованы светодиоды с длиной волны 371 нм и 401 нм. Было показано, что для обеих длин волн UVA излучения наблюдается дозозависимое снижение инфекционного титра вируса.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение, коронавирусы, бычий коронавирус.

Введение. Продолжающаяся больше года пандемия, связанная с распространением вируса SARS-CoV-2, привела к активизации работ по поиску не только специфических средств профилактики и лечения, но и эффективных средств для борьбы с накоплением и распространением инфекционных агентов в окружающей среде. Одним из основных способов распространения вируса, наряду с передачей вируса воздушно-капельным путём при прямом контакте с зараженным человеком, является передача его от человека к человеку через контактные поверхности с последующим занесением на слизистые оболочки глаз, верхних дыхательных путей.

Наличие средств безопасной для человека обработки контактных поверхностей с целью инактивации вирусов и бактерий позволит в существенной степени уменьшить

¹ ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: semtch@gmail.com.

² НИЯУ «МИФИ», 115409 Россия, Москва, Каширское ш., 31.

³ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, 123098 Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.

количество патогенных микроорганизмов и снизить риск передачи вируса от человека к человеку.

За последнее десятилетие группами ученых разных стран была продемонстрирована эффективность инактивации ряда патогенных агентов под воздействием ультрафиолетового излучения в различных диапазонах длин волн – от 220 до 480 нм [1–10]. Действие излучения диапазона UVC ($\lambda = 200 - 280$ нм) с максимумом при 265 нм является наиболее эффективным методом инактивации вирусов и бактерий, поскольку оно хорошо поглощается молекулами РНК и ДНК [2, 5]. Для эффективной борьбы с патогенными агентами дезинфекция должна быть непрерывной в помещениях учреждений здравоохранения, а в период сезонных инфекций – во всех помещениях учреждений образования, промышленных предприятий, предприятий общественного питания и других мест общественного пользования, также как и в общественном транспорте. Использование UVC излучения для этих целей не применимо, т. к. запрещено для использования в присутствии людей из-за ионизирующего воздействия и вызываемых им побочных эффектов на слизистые оболочки и кожу (канцерогенез и др.). Источники UVB ($\lambda = 280 - 315$ нм) и UVA ($\lambda = 315 - 400$ нм) более безопасны для человека, и при соблюдении ограничений по дозе облучения могут быть использованы и в присутствии человека [11].

Исследования последних лет по инактивации патогенных микроорганизмов с использованием источников излучения с длинами волн в диапазоне UVA демонстрируют положительные результаты [5, 12–16], что открывает путь к новой технологии непрерывной деактивации вирусов и бактерий и позволит в существенной степени предотвратить глобальное распространение инфекционных заболеваний.

В данной работе представлены результаты экспериментальных исследований воздействия ультрафиолетового излучения в диапазоне длин волн UVA, безопасном для человека, на инфекционные свойства коронавируса. Для исследований в качестве модельного вируса был выбран бычий коронавирус, который обладает меньшей степенью патогенности по сравнению с SARS-CoV-2. В качестве источника излучения были использованы светодиоды с длиной волны 371 нм и 401 нм. Доза облучения бычьего коронавируса варьировалась путем изменения длительности облучения. Было показано, что для обеих длин волн УФ-излучения наблюдается дозозависимое снижение инфекционного титра вируса.

Материалы и методы. В ФГБУ “НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи” МЗ РФ активно ведутся работы по исследованию противовирусных и противобактериальных средств,

разработан широкий спектр методов, в том числе по исследованию бактерицидных свойств различных субстанций [17, 18]. В качестве вирусных моделей в исследованиях используются различные лабораторные штаммы вирусов, включая коронавирусы животных, а также другие оболочечные вирусы. В настоящей работе исследования на вирус-клеточных системах производилось с использованием отработанных протоколов на базе референс-центра по коронавирусной инфекции НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. В работе использовался бычий коронавирус, который рассматривается как модельная среда для исследования коронавируса SARS-CoV-2 [19, 20]. Стоки бычьего коронавируса получали в процессе острой инфекции клеток MDBK (почка быка), которые культивировали в полной ростовой среде DMEM, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамин (4 mM) и смесь антибиотиков пенициллин/стрептомицин (100 ME/мл; 100 мкг/мл). Титр вируса до облучения составлял 10^5 TCID₅₀/мл. Работы с патогенными микроорганизмами регламентировались правилами работ с биологическими агентами III-IV групп патогенности (Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13).

Определение эффективности инактивации исследуемых патогенных биологических агентов от длины волны и дозы излучения было осуществлено согласно разработанному протоколу с помощью полупроводниковых источников излучения на основе коммерчески доступных светодиодов с длиной волны 371 нм и 401 нм. Для каждого источника

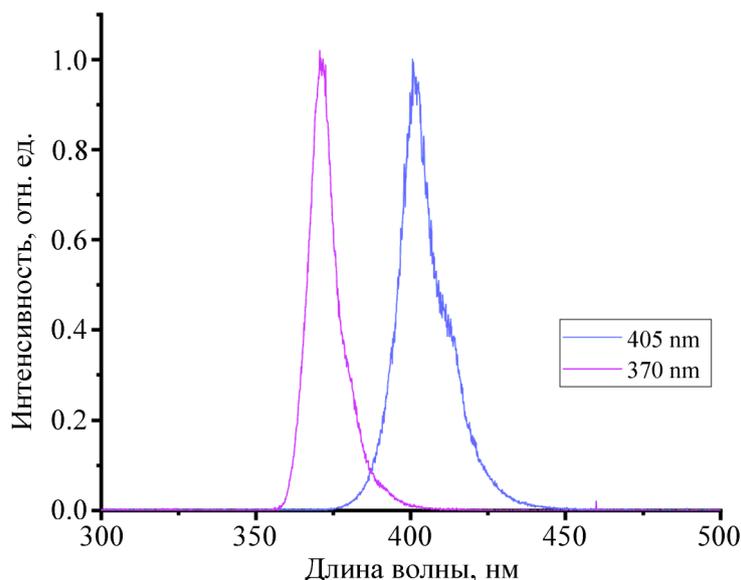


Рис. 1: Спектр излучения источников UVA, длина волны 371 нм и 401 нм.

излучения были проведены измерение энергетических характеристик, проведены работы по обеспечению стабильности излучательных характеристик. Светодиод с длиной волны 371 нм (диапазон UVA) имел выходную мощность 840 мВт. Светодиод с длиной волны 401 нм (диапазон UVA) имел выходную мощность 750 мВт. На рис. 1 представлены спектры излучения используемых светодиодов с длиной волны 371 нм и 401 нм.

Вирусосодержащую жидкость (ВСЖ) с бычьим коронавирусом помещали в ячейки планшета (24-луночный плоскодонный планшет с единой величиной диаметра по высоте лунки). В лунки наливали одинаковое количество (500 мкл) ВСЖ, что обеспечивало одинаковую толщину облучаемого слоя. Планшет с заполненными лунками располагался на зачернённой поверхности под источником излучения. Излучающая апертура светодиода располагалась на расстоянии 4 см от поверхности ВСЖ. Доза облучения определялась как произведение измеренной плотности мощности на поверхности ВСЖ в лунке и времени воздействия.

Лунки планшетов с ВСЖ были промаркированы. Проводилось облучение одновременно четырех лунок с ВСЖ. В качестве контроля использовался исходный необлученный материал (ВСЖ). Схема облучения вируса излучением светодиодов представлена на рис. 2.

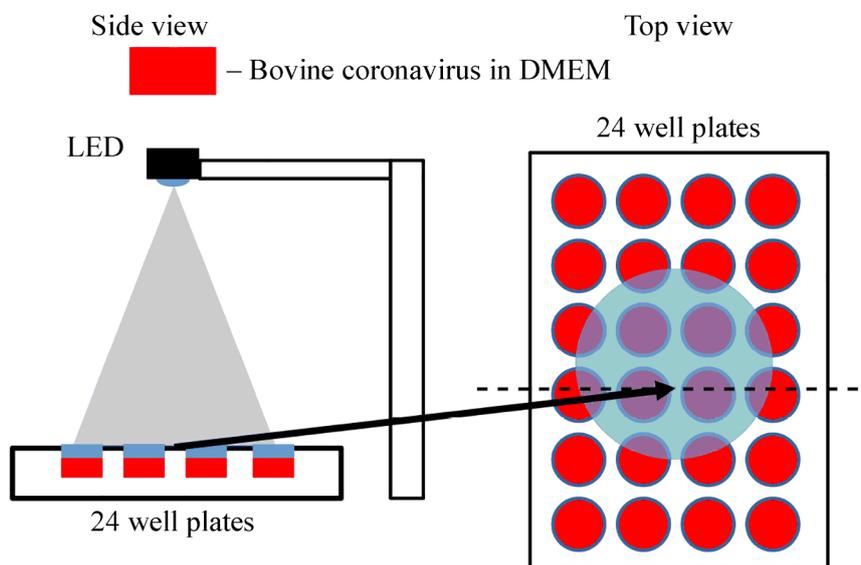


Рис. 2: Схема облучения бычьего коронавируса в 24-луночном планшете.

В табл. 1 приведены значения доз облучения на поверхности питательного раствора с вирусом в зависимости от времени облучения.

Т а б л и ц а 1

*Доза облучения на поверхности питательного раствора с вирусом
в зависимости от времени облучения*

Время воздействия УФ-излучения	Источник 1—371 нм (UVA). Доза облучения	Источник 2—401 нм (UVA). Доза облучения
0 (контроль)		
10 мин	8.4 Дж/см ²	7.5 Дж/см ²
20 мин	16.8 Дж/см ²	15 Дж/см ²
40 мин	33.6 Дж/см ²	30 Дж/см ²

После облучения инфекционность бычьего коронавируса анализировалась по следующей методике. Облученная ВСЖ собиралась в пробирку, после чего готовились десятикратные разведения с 10^{-1} до 10^{-6} . Для этого в пробирку с 0.9 мл среды DMEM добавляется 0.1 мл облученной ВСЖ, после чего производятся последовательные разведения до 10^{-6} . За сутки до эксперимента культура клеток MDBK высевалась в 96-луночные планшеты в концентрации 2.5×10^4 клеток/лунку. Титрование ВСЖ проводится в четырех повторах (по 200 мкл на лунку) на клетках MDBK, для чего из планшета с монослоем клеток убирается ростовая среда и вносятся приготовленные разведения ВСЖ. После этого 96-луночные планшеты инкубируются в течение 5 суток при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ и 98% влажности. Титр вируса выражается в TCID₅₀/мл, на основе вирус-индуцированного цитопатического эффекта.

Результаты экспериментов. Результаты экспериментов приведены на рис. 3.

Наиболее высокое снижение титра вируса наблюдается при обработке вирусосодержащей жидкости светодиодом с длиной волны 371 нм в течение 40 минут. Для воздействия обеими длинами волн светодиодов (371 нм и 401 нм) наблюдается дозозависимое снижение инфекционного титра вируса, в зависимости от времени обработки.

Механизм, лежащий в основе инактивационного действия излучения диапазона UVA, пока до конца не изучен. Одним из возможных механизмов повреждения вируса можно рассматривать формирование активных форм кислорода. Например, в результате генерации синглетного кислорода может реализоваться механизм окислительного повреждения РНК вируса [21, 22]. Формирование активных форм кислорода, предположительно, происходит при поглощении излучения эндогенными сенсбилизаторами внутри системы “бычий коронавирус+DMEM”. Дальнейшее развитие работ предполагает установление кинетики и механизма фотоиндуцированной инактивации молекул нуклеиновых кислот, белков, липидов вирусов при воздействии излучения в диапазоне

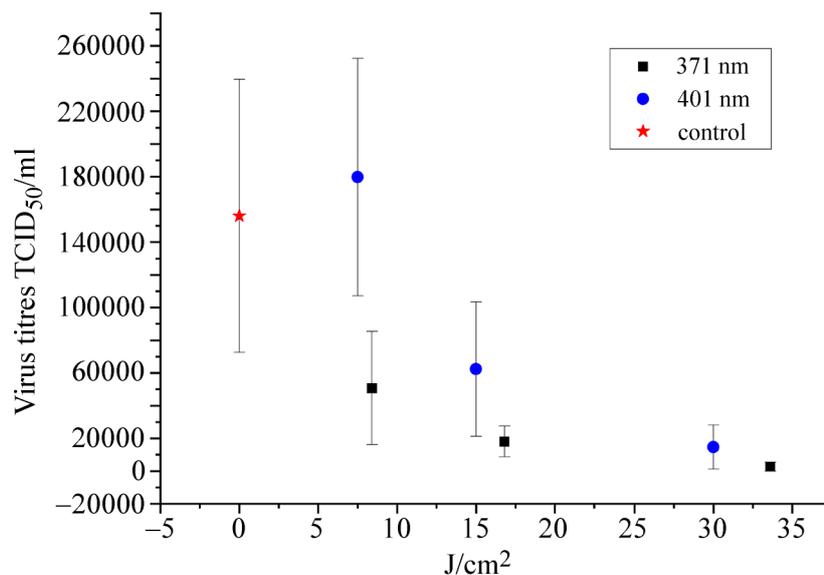


Рис. 3: Зависимость величины титра бычьего коронавируса от дозы облучения для длин волн 371 и 401 нм.

UVA, и определение чувствительности штаммов вирусов и бактерий и зависимости эффективности инактивации от дозы и длины волны излучения, что позволит в дальнейшем разработать эффективную технологию предотвращения распространения вирусных и бактериальных инфекций.

Заключение. Представлены результаты экспериментальных исследований воздействия ультрафиолетового излучения в диапазоне длин волн UVA на инфекционные свойства коронавируса. Для исследований был выбран бычий коронавирус. В качестве источника излучения использовались светодиоды с длиной волны 371 нм и 401 нм. Было обнаружено, что для обеих длин волн UVA излучения наблюдается дозозависимое снижение инфекционного титра вируса.

Полученные в ходе исследований результаты могут стать основой разработки безопасной для человека технологии дезинфекции светом, которая в перспективе может стать универсальной и, безусловно, самой биосовместимой стратегией борьбы с патогенными биологическими агентами, независимо от того, являются ли они вирусами, бактериями или грибами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60292.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] P. Luzzatto-Fegiz, F. Temprano-Coletto, F. J. Peaudecerf, et al., UVA Radiation Could Be a Significant Contributor to Sunlight Inactivation of SARS-CoV-2. *bioRxiv* (2020), pp. 2–9. DOI: 10.1101/2020.09.07.286666.
- [2] Y. Gerchman, H. Mamane, N. Friedman, and M. Mandelboim, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **212**, 112044 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112044.
- [3] R. M. Tomb, M. Maclean, J. E. Coia, et al., *Food Environ. Virol.* **9**, 159 (2017). DOI: 10.1007/s12560-016-9275-z.
- [4] R. M. Tomb, M. Maclean, P. R. Herron, et al., *Bacteriophage* **4**(3), e32129 (2014). DOI: 10.4161/bact.32129.
- [5] L. Horton, A. E. Torres, S. Narla, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **19**(10), 1262 (2020). DOI: 10.1039/D0PP00221F.
- [6] О. В. Кузьмин, Н. И. Фасхутдинова, *Biomed. Photonics* **6**(4), 37 (2017).
- [7] Н. И. Фасхутдинова, О. В. Кузьмин, *Медицинская физика* **76**(4), 37 (2017).
- [8] М. G. Strakhovskaya, G. A. Meerovich, A. N. Kuskov, et al., *Laser Phys. Lett.* **17**(9), 093001 (2020). DOI: 10.1088/1612-202X/abab14.
- [9] С. В. Костюченко, А. А. Ткачев, Т. Н. Фроликова, *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика* **19**(5), 112 (2020). DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-5-112-119.
- [10] А. А. Смирнов, И. М. Довлатов, *Вестник НГИЭИ* **115**(12), 49 (2020). DOI: 10.24411/2227-9407-2020-10119.
- [11] O. P. Egambaram, S. Kesavan Pillai, and S. S. Ray, *Photochem. Photobiol.* **96**(4), 779 (2020). DOI: 10.1111/php.13208.
- [12] M. E. R. Darnell, K. Subbarao, S. M. Feinstone, and D. R. Taylor, *J. Virol. Methods* **121**(1), 85 (2004). DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.06.006.
- [13] K. Song, M. Mohseni, and F. Taghipour, *Water Res.* **163**, 114875 (2019). DOI: 10.1016/j.watres.2019.114875.
- [14] C. S. Heilingloh, U. W. Aufderhorst, L. Schipper, et al., *Am. J. Infect. Control* **48**(10), 1273 (2020). DOI: 10.1016/j.ajic.2020.07.031.
- [15] R. Nishisaka-Nonaka, K. Mawatari, T. Yamamoto, et al., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **189**(6), 193 (2018). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.017.
- [16] R. de Santis, V. Luca, G. Faggioni, et al., *medRxiv* **2**(6), (2020). DOI: 10.1101/2020.06.18.20134577.

- [17] M. V. Fursov, R. O. Abdrakhmanova, N. P. Antonova, et al., *Viruses* **12**(5), 545 (2020). DOI: 10.3390/v12050545.
- [18] N. P. Antonova, D. V. Vasina, E. O. Rubalsky, et al., *Biomolecules* **10**(3), 440 (2020). DOI: 10.3390/biom10030440.
- [19] R. S. Joshi, S. S. Jagdale, S. B. Bansode, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020) pp. 1–16. DOI: 10.1080/07391102.2020.1760137.
- [20] N. Yoshizawa, R. Ishihara, D. Omiya, et al., *Viruses* **12**(12), 1372 (2020). DOI: 10.3390/v12121372.
- [21] C. P. Sabino, A. R. Ball, M. S. Baptista, et al., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **212**, 111999 (2020). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111999.
- [22] T. Kohn and K. L. Nelson, *Environ. Sci. Technol.* **41**(1), 192 (2007). DOI: 10.1021/es061716i.

Поступила в редакцию 19 апреля 2021 г.

После доработки 16 мая 2021 г.

Принята к публикации 17 мая 2021 г.