
1. Einleitung

Virusinaktivierung ist im Rahmen therapeutischer Maßnahmen von viralen Infektionen, zur Sicherstellung der Infektionsfreiheit von Blutprodukten sowie zur Impfstoff-Herstellung notwendig. Darüber hinaus ist die Virusinaktivierung eine wichtige Maßnahme aus dem Bereich der Hygiene zur Flächen-, Luft- und Abwasserentkeimung.

1.1 Virusinaktivierung im Rahmen therapeutischer Maßnahmen

1.1.1 Chemotherapie

Nur für wenige Viruskrankheiten existiert die Option einer pharmakologischen Therapie. Mit Hilfe von Chemotherapeutika kann der Replikationszyklus einiger Viren an verschiedenen Zielpunkten inhibiert werden. Zur Bekämpfung von Virusinfektionen der Herpesgruppe werden zur Zeit vier Medikamente eingesetzt: Aciclovir, Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir. Diese Substanzen gehören zu der Stoffklasse der Nukleosid- bzw. Nukleotidanaloga und greifen in den DNA-Replikationszyklus der Viren ein, wodurch dieser gehemmt wird (Vogel et al., 1997). Mit Hilfe dieser Medikamente lässt sich die Krankheitsprogression lediglich verringern, eine Heilung im Sinne einer Virus-Eradikation ist nicht möglich. Die meisten chemotherapeutisch antiviral wirksamen Medikamente wurden in den vergangenen Jahren durch umfangreiche Forschungsarbeit zur Bekämpfung der HIV-Infektion entwickelt (Deutsche AIDS-Gesellschaft, 2000; Gröschel et al., in press). Zur Bekämpfung von Hepatitiden (A-G) wird eine chemotherapeutische Therapie mit Interferon- α und Ribavirin (HBV, HCV) angeboten, welche bei einem Teil der Behandelten zum Erfolg führt (Wang et al., 2000). Abgesehen von der Begrenztheit der Möglichkeiten für antivirale Therapien sind fast alle diese Maßnahmen relativ kostenintensiv, so dass sie nur einigen Patienten in den wohlhabenden Industrienationen zur Verfügung stehen.

1.1.2 Passive Impfung

Die passive Impfung mit Hyperimmunglobulinen stellt eine weitere therapeutische Möglichkeit dar, um akute Virusinfektionen wie z.B. Tollwut zu stoppen (Lin et al., 1988). In einigen Fällen, insbesondere durch nicht-neutralisierende Antikörper, kann diese Anwendung jedoch kontraproduktiv im Sinne eines Enhancement der Krankheitserscheinungen sein, z.B. bei der FSME-Hyperimmunglobulingabe bei Kindern (Vlasimska and Smejkalova, 1995).

1.1.3 Genthherapie

Die Genthherapie stellt eine neue Behandlungsform dar, bei der die zelluläre Erbinformation durch Einbringung von veränderten oder fremden Gensequenzen verändert wird. Neue Gene können den Zellen neue Eigenschaften wie z.B. die Produktion von Virusbestandteilen oder eine Resistenz vermitteln. Bei HIV wird versucht, die Ablesung und Umsetzung der genetischen Information z.B. dadurch zu blockieren, dass in die Nukleinsäure künstliche Moleküle eingebaut werden oder RNA durch Ribozyme zerteilt und damit für die Virusvermehrung unbrauchbar wird (Buchschacher and Wong-Staal, 2001).

1.1.4 Grenzen der therapeutischen Maßnahmen

Das therapeutische Arsenal gegen viral bedingte Krankheiten ist, im Vergleich zu jenen durch Bakterien oder Parasiten verursachten, vergleichsweise klein. Für hochvirämisch, akut verlaufende Virusinfektionen wie z.B. Dengue-Fieber (Dengue-Hämorrhagisches Fieber, Dengue-Schock-Syndrom), Lassa-Fieber, Marburg-Fieber, Ebola-Fieber, Gelbfieber, Rift-Valley-Fieber, Japan-B-Enzephalitis, Krim-Kongo-Fieber, Hantaan-Fieber oder die Südamerikanischen hämorrhagischen Fieber gibt es im allgemeinen keine Therapieoptionen (Streether et al., 1999).

Eine universelle Methode zur Virusabreicherung im Blut von letal bedrohten Patienten wäre hier wünschenswert. Der experimentelle Ansatz zum Einsatz von Virusinaktivierung durch UV-Bestrahlung von Blut soll mit dieser Arbeit untersucht und begründet werden.

1.2 Virusinaktivierung von Blutprodukten

Eine Inaktivierung von Viren in therapeutisch eingesetzten Blut und Blutprodukten ist notwendig, um eine Gefährdung von Patienten zu verhindern. Folgende Inaktivierungsverfahren zur Herstellung von Blutprodukten wie z.B. Plasma, Hyperimmunglobulinpräparate, Faktor VIII-Präparate und Thrombozyten-Konzentrate werden zur Zeit angewendet (Rabenau et al., 1997):

- Solvent-Detergent-Verfahren
- pH-Wert-Absenkung
- Thermische Inaktivierung (Pasteurisierung)
- Betapropiolacton-Inaktivierung
- Gamma-Strahlung
- Methylenblau
- PUVA (Psoralen + UVA-Bestrahlung)
- Ethanolfraktionierung (Cohn)

1.3 Virusinaktivierung zu Forschungszwecken

Replikationsdefekte Viren mit intakten Oberflächenantigenen werden in der Forschung gebraucht, um zum Beispiel zwischen Wirkungen differenzieren zu können, die entweder durch Antigene oder durch Nukleinsäure-Replikation hervorgerufen werden. Replikations-defekte Viren können durch UVB-Bestrahlung hergestellt werden (Cinatl et al., 2000).

1.4 Virusinaktivierung zur Impfstoff-Herstellung

Der überwiegende Anteil von viralen Totimpfstoffen wird durch Inaktivierung der entsprechenden Viren hergestellt (z.B. Formaldehydinaktivierung), bei der möglichst die Antigenität voll erhalten bleiben sollte (Wang et al., 1995; Brown 1993).

1.5 Virusinaktivierung durch UV-Bestrahlung

1.5.1 Ultraviolette-Strahlung

Als erster entdeckte J.W. Ritter im Jahre 1801, dass jenseits des violetten Endes des sichtbaren Spektrums noch Strahlung existiert, indem er deren photochemische Wirkung nachwies (Barth, 1987). Diese Strahlung heißt Ultraviolette (UV) Strahlung. Die obere Grenze ihres Spektrums wird bei 400 nm angesetzt. Am kurzwelligen Ende geht sie allmählich in die weiche Röntgenstrahlung über. Coblenz (1943) unterteilte das UV-Spektrum in die Bereiche UVA (320-380 nm), UVB (290-320 nm) und UVC (100-290 nm). Nach DIN 5031 wird die UV-Strahlung wie folgt unterteilt: UVA (315-380 nm), UVB (280-315 nm) und UVC (100-280 nm) (Abb. 1).

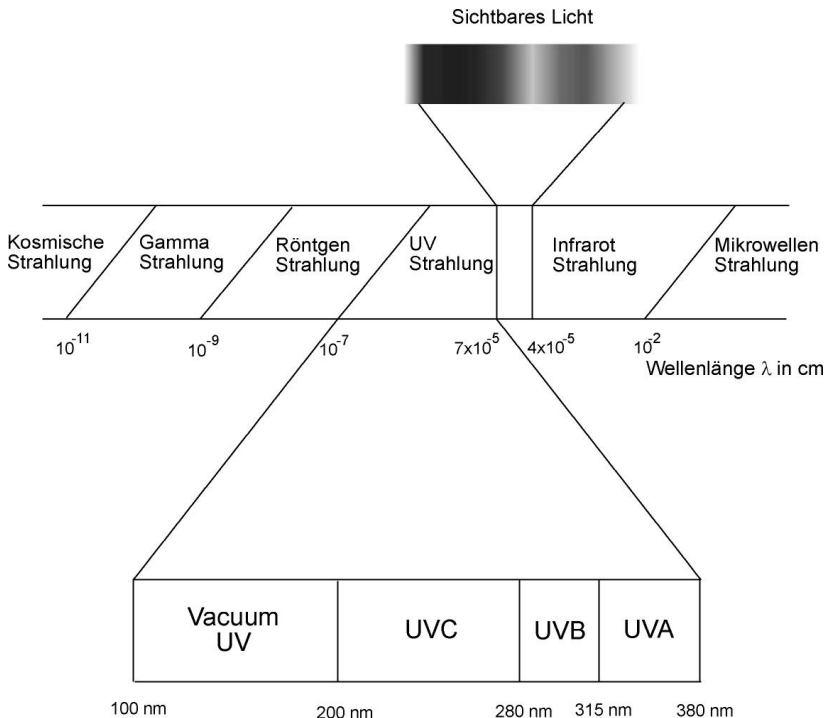


Abb. 1: Elektromagnetisches Spektrum

Die Gleichung von Planck zeigt, dass die Energie einer Strahlung mit fallender Wellenlänge zunimmt:

$$E = h \cdot c / \lambda$$

E = Energie eines Photons in J/cm^2 , h = Plancksches Wirkungsquantum ($6,625 \times 10^{-34}$ Js), c = Lichtgeschwindigkeit (3×10^{10} cm/s), λ = Wellenlänge (cm).

Relativ langwellige Infrarote Strahlung erregt Atome und Moleküle zu Resonanzschwingung, die Absorption der Strahlungsenergie resultiert in Erwärmung. Licht kürzerer Wellenlängen kann zu photochemischen Reaktionen führen wie etwa Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

1.5.2 UVA-Strahlung

UVA hat eine relativ lange Wellenlänge, dabei aber eine vergleichsweise hohe Eindringtiefe. Ohne photoaktive Substanzen entfaltet UVA relativ geringe Auswirkung auf biologische Materialien. Im wesentlichen beruhen die Schädigungen der UVA-Strahlung auf der Entstehung von Sauerstoffradikalen (reaktive Sauerstoffspezies = ROS). UVA-Strahlung kann dadurch lokal und entfernt vom Ort der Strahlung den Bruch chemischer Bindungen herbeiführen und das zelluläre Erbgut schädigen (Cadet et al., 1997). Schädigungen sind ab einem Bereich von $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ zu erwarten (eigene Untersuchungen mit Vorhautfibroblasten).

1.5.3 PUVA-Therapie

Im klinischen Bereich wird die sogenannte PUVA-Therapie eingesetzt. Diese Therapieform wird hauptsächlich zur Behandlung der Psoriasis, Vitiligo, Mycosis fungoides und Sezary Syndrom angewendet (Fitzpatrick et al., 1966; Parrish et al., 1977a,b). Sie besteht aus der oralen oder topischen Gabe des photosensibilisierenden Stoffes 8'-Methoxy-Psoralen (oder Derivaten) und nachfolgender Bestrahlung mit langwelligem (320-390 nm) UVA-Licht hoher Intensität. Psoralen interkaliert zwischen DNA-Stränge und wird durch UVA-Strahlung aktiviert. Psoralene blockieren die Nukleinsäure-Replikation durch Bildung von Brückenbindungen mit den Pyrimidinbasen (Groene and Shaw, 1992). Neben der Anwendung am Patienten wurde

dieses Verfahren auch zur Virusinaktivierung von Thrombozyten-Konzentraten evaluiert (Lin et al, 1993; Margolis-Nunno et al., 1997).

1.5.4 UVB-Strahlung

UVB-Strahlung hat eine höhere Potenz biologische Schädigung hervorzurufen, da das Energie-Niveau ausreichend hoch ist, um kovalente Bindungen aufzulösen. Die Wirkung der UVB-Strahlung ist zu einem hohen Anteil darauf zurückzuführen, dass die Strahlungsenergie von Nukleinsäure absorbiert wird und dadurch schädigende Reaktionen induziert werden. Die Art der Schädigungen ist überwiegend gekennzeichnet durch Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD), die durch kovalente Bindung von benachbarten Pyrimidinen einer Polynucleotid-Kette entstehen. Ferner ist unter anderem die Bildung von Pyrimidin-Pyrimidon-Läsionen (6-4 Läsionen) von Bedeutung (Black et al., 1997). Schädigungen sind ab einer Dosis von etwa $0,2 - 1 \text{ J/cm}^2$ zu erwarten (Krutmann et al., 1997; Emri et al., 2000). UVB-Strahlung wird in der Dermatologie, z.B. bei Psoriasis, therapeutisch eingesetzt (Abel et al., 1995) und ist zur desinfizierenden Behandlung von Thrombozytenkonzentraten evaluiert worden (van Prooijen et al., 1990).

1.5.5 UVC-Strahlung

UVC-Strahlung ist die aggressivste UV-Strahlung. Durch weitgehende Absorption der Strahlung durch biologische Materialien, Flüssigkeiten und auch Kunststoffmaterialien hat sie nur eine geringe Eindringtiefe. Das sogenannte Vakuum-UVC (100-200 nm) wird bereits durch Luft absorbiert. UVC-Strahlung kann organische Moleküle zerstören sowie ionisieren. Die Absorption der UVC-Strahlung von DNA ist drei Zehnerpotenzen höher als die der UVB-Strahlung. Das große Zerstörungspotential der UVC-Strahlung erklärt sich durch den hohen Energieanteil der kurzen Wellenlängen, so dass mit dieser Strahlung bereits Proteine zerstört werden können. UVC-Strahlung wirkt damit stark zelltoxisch und mutagen. Schädigungen sind ab einer Dosis von 1 mJ/cm^2 zu erwarten (Stary et al., 1997). Ein Einsatzgebiet der UVC-Strahlung ist die Luftentkeimung von Operationssälen (Berg-Perier et al., 1992).

2. Zielsetzung

Um viral bedingte Krankheiten zu heilen oder deren Fortschreiten zu verlangsamen, verwendet man verschiedene therapeutische Strategien. Dazu zählt der Einsatz von Chemotherapeutika sowie therapeutische Impfungen oder gentechnische Ansätze.

Dennoch existieren immer noch zu wenige effiziente therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung vieler verschiedener Virusinfektionen.

Die Idee mit physikalischen Maßnahmen bei einer virämischen Krankheit die Viruslast im Blut zu verringern, soll eine neue therapeutische Möglichkeit für letal bedrohende, akut verlaufende Krankheiten eröffnen.

Der virusinaktivierende Effekt von UV-Licht soll dazu genutzt werden, um durch Bestrahlung von Blut eine deutliche Verringerung der Anzahl von pathogenen Viren zu erzielen sowie einen Impfeffekt zu provozieren.

Um diese *in vivo* Anwendung beim Patienten zu ermöglichen, soll der experimentelle Ansatz zum Einsatz von UV-Virusinaktivierung in dieser Arbeit durch *in vitro* Versuche untersucht und begründet werden.

Darüberhinaus soll die Anwendbarkeit von UVB-Strahlung zur Produktsterilisation von virushaltigen Flüssigkeiten evaluiert werden. Mögliche Anwendungsgebiete dafür sind Herstellung von Impfstoffen sowie Blutprodukte aller Art, wie z.B. Plasma-, Gerinnungs- oder Thrombozytenpräparate.

3. Material

3.1 Chemikalien

Aceton	Riedel-de Häen, Seelze
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma, Heidenheim
Aqua ad. injectibila	Braun, Melsungen
BSA	Sigma, Heidenheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, abs.	Riedel-de Häen, Seelze
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Hepes	Roth, Karlsruhe
IMDM	Biochrom, Berlin
MEM	Seromed, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
N,-N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
PBS ohne Mg- und Ca-Ionen	Biochrom, Berlin
Penicillin	Grünenthal, Stolberg
Salzsäure konz.	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem, San Diego
Streptomycin	Sigma, Heidenheim
Thimerosal	Sigma, Heidenheim
Tris	Amersham, Braunschweig
Tris-HCL	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Heidenheim
Trypsin	Sigma, Heidenheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Gibco BRL, Eggenstein