

ФОТОДИНАМІЧНА ІНАКТИВАЦІЯ ВІРУСІВ. ПРОТОТИПИ. ОСМИСЛЕННЯ ТА ГРУНТАЦІЯ (МИНУЛЕ ТА СУЧАСНІСТЬ)

^{1,2}Торяник І.І., ¹Мінухін В.В., ¹Мелентьєва Х.В.,

¹Моїсєєнко Т.М., ¹Христян Г.Є.,

⁴Мельник А.Л., ³Большакова Г.М.,

¹Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова Національної
академії медичних наук України»

²Харківський національний медичний університет,

³Навчально-науковий медичний інститут
Національного технічного університету
«Харківський політехнічний інститут»,

⁴Запорізький державний медичний університет

Вступ. Дискусії навколо проблеми фотодинамічних методів [1-7] інактивації вірусів, з огляду на ефективність застосування їхніх найбільш верифікованих результатів у створенні вакцин (живих, інактивованих, субодиничних, рекомбінантних, синтетичних; анатоксинів), орієнтують наукову спільноту на детальний аналіз та непрагматичну об'єктивізацію ключових прототипів, як засобів науково-теоретичної ґрунтації питань за тематикою [8-14]. Провідним прерогативним положенням такого підходу (метааналітичного) є агрегування інформації до вищого ступеня статистичної потужності [15], більшої оціночної надійності, ніж це можна отримати за результатами окремих досліджень. Вивчення реферативних аналізів (ретроспективних, у тому числі) за результатами фотодинамічної інактивації вірусів з метою застосування отриманих феноменів для створення, опробування та виробництва вакцин показало наявність мізерного числа джерел за пошуковою тематикою (як в Україні, так і за її кордонами) [16-19]. Зважено відносячись до поставлених завдань та усвідомлюючи факт унеможливлення на даному етапі розробки об'єднаної оцінки, наближеної до маловідомої нам на сьогодні загальної істини (отримання вакцин методами фотодинамічної інактивації), аналіз профільних проблематики наукових джерел проводили на кількох сотнях інформативних аналізів (за базами: Scopus, PubMed, Web of Science, CrossRef, Index Copernicus.. Відповідно заданим параметрам пошуку дотримувались принципів, рекомендованих укладачами «Кокранівської співпраці», застосовуючи поєднання доказів / інформації з якісних досліджень, для доказовості контексту систематичних оглядів (за прототипами: віруси, ідентифікація, характеристика, метаболізм та клітинні структури; фотодинамічна інактивація, методи, фотосенсибілізатори; фотореактивація; лізис, імунні ресурси хазяїна. До речі, успішне розв'язання проблеми фотоінактивації вірусів традиційно зосереджене у площині всебічного усвідомлення біологічної сутності останніх) [20-22]. Авторами публікації цілком усвідомлена неминуча суб'єктивність аспектів вибору, що, очевидним чином, впливає на результати, включаючи рішення щодо пошуку досліджень, їхнього ототождження на основі

набору об'єктивних критеріїв, розгляд та аналіз неповних даних, врахування упередженості публікацій. Серед іншого, виконавцями обов'язковим чином враховувалась можливість впливу зауважених вище факторів на результати дослідження у цілому.

Мета: провести аналіз сучасних та ретроспективних аналізів реферативних джерел стосовно проблеми фотодинамічної інактивації вірусів та подальшого застосування результатів для створення вакцин.

Матеріалом дослідження стали реферативні аналізи (ретроспективні, у тому числі), архіви, копії лабораторних проб з результатами фотодинамічної інактивації вірусів з метою застосування отриманих феноменів для створення, опробування та виробництва вакцин. Об'єм дослідження комплектувався даними багаторічних розробок (первинний матеріал за експериментальними дослідженнями, копії витягів зі звітів; фрагменти-розділи поточних науково-дослідних робіт з проблеми фотоінактивації вірусів на моделі бактеріофагу), що отримані у лабораторії вірусних інфекцій ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (2021-2023 рр.). З метою об'єктивізації роботи проводили розширений аналітичний огляд тематичних джерел науково-теоретичної, методологічної, патентної інформації (за ключовими прототипами, зазначеними вище). Пошук проводили за базами даних бібліографічних ресурсів пошукових систем «Google», «Yandex», «Rambler» та інші.

Ідентифікація вірусів. Характеристики. Метаболізм та клітинні структури. Ідентифікація вірусів сприяє застосуванню уточнених алгоритмів фотоінактивації, отриманню рішучих за якісними та кількісними параметрами результатів. Є очевидним фактором об'єктивізації останніх. Ідентифікація вірусів лежить у площині нарративу ґрунтовної верифікації даних. Однією із прагматичних цілей універсальної таксономічної системи (UTC) є ідентифікація вірусів. Незважаючи на те, що її побудовано на умовно обраних ієрархічних рівнях (родина, рід, вид, штам, варіант), у термін «ідентифікація» міцно імплантовано прикметник «однозначна». Стислість UTC не позбавляє дослідників вказувати належність кожного із застосовуваних у наукових розробках вірусів до відповідних родини / роду / виду / штаму / варіанту, надавати детальні позначення, опрацьовані спеціалізованими фаховими групами. Авторитетним орієнтиром та ключовим показником номенклатури вірусів являється останній звіт Міжнародного комітету з таксономії вірусів «Класифікація та номенклатура вірусів» [21-22].

Характеристики вірусів, що застосовуються у створенні таксонів на тепер, є доволі поліморфічними (простими, складними, раціональними, історично закріпленими). Прерогативи серед останніх мають властивості, пов'язані із складом амінокислот та протеїнів, типом реплікації. Новаторські вимоги сьогодення орієнтовані на властивості вірусів, які є визнано доступними для диференціації та діагностики:

методологія характеризації нуклеїнових кислот (нуклеотидний склад, олігонуклеотидне картирування, картирування із застосуванням ферментів рестрикції, гібридизації, визначення повторних інвертованих послідовностей, гетеродуплексне картирування). Однак останнє не знайшло широкого вжитку та, нажаль, не призвело до очікуваного успіху. Традиційно авангардними залишаються морфологічні методи дослідження (ультрамікроскопічні: растрова та трансмісійна електронна мікроскопія), відповідно рівню організації живого (віріони, інфіковані клітини, - їхні структура, розмір, тип морфогенезу, його локалізація, наявність чи відсутність зовнішньої оболонки). Характеристики вірусів отримують за рахунок візуалізації та результатів ультрамікроскопічних досліджень із застосуванням негативного контрастування, серологічних методів, визначення стійкості до різних факторів (зміни рН, температури, дії окремих типів розчинників (ліпідів) тощо). Важливим інтегральним параметром залишається морфологія віріона. Зазначені ідентифікація та характеристика мають роками підтверджену ефективність, що сприяє оптимальним вибору та супроводу експериментів з фотоінактивації вірусів та їхніх екстраполяцій у практику [20-22].

Відповідно до структурно-функціональної специфіки вірусів їхній метаболізм здійснюється лише у певних компартментах клітини. Завдання останніх упорядковувати процеси, що супроводжують розвиток вірусів та спонукати/сприяти комплементарності / тяжінню віріонів на етапах онтогенетичного циклу розвитку. Арсеналом засобів та резервами вибіркової екстракції експериментально доведена взаємодія між вірусами та клітинним каркасом. Накопичені провідними фахівцями галузі дані свідчать на користь реалізації декількох кардинальних принципів, що створюють об'єктивний методологічний фундамент детекції інгібуючих властивостей фізико-хімічного (фотодинамічного, у тому числі) впливу на віруси. Серед потужних маркерів називають функціональні складові метаболізму вірусних нуклеїнових кислот (реплікація, транскрипція, трансляція мРНК) [23]. Встановлено, що вони здійснюються за лаштунками ядерних та цитоплазматичних органел інфікованої вірусом клітини. На відміну цього, поведінка протеїнових фракцій вірусів є більш різноманітною. Сенса анонсованого полягає у наявності двох вкрай різних способів упаковки вірусних протеїнів (залежно від наявності у них або відсутності оболонок). У комплектації безоболонкових вірусів, скоріш над усе, беруть участь розчинні білки. У вірусів, що мають оболонки ситуація розігрується інакше. Її визначає відсутність розчинної фази протеїнів, яка потенціє утягнення у процес більш потужних ресурсів зараженої клітини хазяїна (наявним прикладом являється поведінка вірусів простого герпесу та везикулярного стоматиту, структурні білки яких не є розчинними). Неструктуровані вірусні протеїни, - полімери, поведінка яких інакше.

Фотодинамічна інактивація.
Фотосенсибілізатори. Історичні корені та сучасність. Сьогодення та перспективи

фотодинамічної інактивації мікроорганізмів (бактерій, вірусів) свідчать на користь їхнього широкого застосування, зокрема, як новітніх засобів терапії у масштабах різних галузей медицини. Фахівцями наголошується не лише на ролі фотодинамічної терапії, але й її різновиду — антимікробної / антивірусної фотодинамічної / фотоінактиваційної терапії. Незважаючи на глибокий історичний пласт численних свідчень щодо позитивного ефекту фотодинамічного впливу на біологічний субстрат, практичний інтерес до нього з'явився відносно недавно [1, 2, 16, 24]. У другій половині минулого століття, коли світове наукове товариство пізнало потужний потенціал властивостей лазерного опромінювання та роль сучасних фотосенсибілізаторів у оптимізації його параметрів, фотоінактивацію стали вважати вагомим інструментом боротьби із мікроорганізмами. Всі етапи концептуального становлення та опрацювання методологічних аспектів носили суто еволюційний характер. Примітивна медицина давнього світу (Єгипет) застосовувала у лікуванні інфекцій (шкіри, слизових, зокрема) фотодинамічний потенціал сонця та світлочутливі речовини рослин, що зумовлювали фотореакцію у клітинах останньої та сприяли прискореному загоєнню ран. Свідчення стосовно ефективності фотодинамічних процедур наведені також у Еберському папірусі та Atharvaveda [24]. У XIII столітті арабськими медиксами використовувалась тинктура із меду та порошку насіння ейстрілалі як фотосенсибілізатор у цілісному курсі фотоінактивації збудників найпоширеніших на тоді інфекційних уражень шкіри. Ефективність препарату виявилась настільки високою, що рецептура у різних її варіантах дійшла до наших часів. Ідентифіковану як кмин китайський (Ammi Majus), ейстрілалі пізніше стали застосовувати у якості сенсибілізатора для лікування червоного плескатоного лишая, інфекційного нейродерміту, герпетичної, ранової інфекції. Сучасний фармацевтичний ринок пропонує препарат Амміфурин®, який містить (Ammi Majus) та є вельми ефективним у разі інфекційних хвороб шкіри. Терапевтичний ефект таких речовин полягав у фотосенсибілізуючій дії, без застосування кисню.

Кисневозалежний фотодинамічний ефект був анонсований О. Raab (1900, Мюнхенський університет, лабораторія Н. von Tarpeiner). Отримані експериментальні результати націлили вчених на думки щодо терапевтичного застосування флуоресцентних субстанцій у комбінації з опромінюванням світлом. Клінічні трайли, проведені науковим колективом на чолі з дерматологом Н. Jesionek на пацієнтах із туберкульозом та сифілісом, показали шокуючі та той час результати. *Locus morbi* піддавали фотоінактивації сонячним спектром на тлі застосування фотосенсибілізаторів та спостерігали суттєве поліпшення стану шкіри. 1903 рік був ознаменований першими успішними фотодинамічними процедурами у хворого на рак шкіри (Н. von Tarpeiner та Н. Jesionek). У 1905 році було отримано позитивні результати (з відсутністю рецидивів упродовж 1 року) у чотирьох пацієнтів з

онкологічними захворюваннями шкіри. Як фотосенсибілізатор стали використовувати розчин еозину, уражені ділянки опромінювали сонячним / штучним світлом (дугова лампа). Н. von Tarpeiner (1904) було запроваджено термін «*фотодинамічна реакція*» для опису специфічної фотохімічної реакції, у наслідок якої відбувалась тотальна руйнація / інактивація біологічних систем / організмів (за умов опромінення світлом та використання кисню і барвників, що поглинали випромінювання) [18]. Фахові довідники не встигали за темпами науково-технічного прогресу. Отже, активно вживану спеціалістами термінологічну базу замінили більш прагматичними версіями.

Фотодинамічна інактивація резистентних штамів патогенних мікроорганізмів / вірусів є одним із перспективних методів боротьби з інфекційними захворюваннями [4, 5, 7, 13, 25], що ґрунтується на антибактеріальній / антивірусній дії реактивних форм кисню. Останні у формі синглетного кисню, вільних радикалів утворюються у разі окислення тих чи інших фотосенсибілізаторів за умов наявності світлового пучка. Синглетний кисень та вільні радикали впливають на різні таргетні структури мікробної клітини, пошкоджуючи як її ядерні, так і цитоплазматичні компоненти, унеможливаючи реалізацію стандартних метаболічних шляхів [23]. Фахівцями зауважується на тому, що з клітин грампозитивних та грамнегативних бактерій під впливом реактивних форм кисню утилізуються плазмідні, руйнуються одно- та дволанцюгові ДНК (останнє стосується переважним чином вірусів), залишки гуаніну [17]. З огляду на те, що молекули ДНК здатні до відновлення завдяки активності власних репаративних систем, згадані вище uszkodження не мають підстав вважатись основною причиною некрозу клітини або її аутолізу. З іншого боку, виразна ліпофільність переважної кількості фотосенсибілізаторів сприяє акумуляції останніх на клітинних мембранах, чому сприяє їхній подвійний ліпідний шар. Таким чином, клітинна мембрана стає найвразливішою структурою для реактивних форм кисню, її uszkodження призводять до поступової втрати клітинного вмісту, інактивації мембранних транспортних систем, синтезу протеїнів *de novo*. За спостереженнями фахівців, зазначені феномени призводять до інтенсивного виходу за межі оболонкових структур клітини іонів калію з їхньою подальшою стабільною втратою клітинами на тлі репродуктивних етапів розподілу та формування мультимінарних структур.

Іншим важелем впливу на процеси інактивації вірусів (та не лише їх) є *фотосенсибілізатори* [18, 26], застосування яких вимагає вкрай ретельних підходів. Морфологічна детермінованість клітин, структурна специфіка вірусів (оболонкових та безоболонкових), грампозитивних і грамнегативних бактерій, сприяють розбіжностям у ефективності функціонування різних фотосенсибілізаторів, із ними спектру реакцій на фотодинамічний вплив. Наукові дискусії точаться навколо структурної домінантності мембран збудників, що підлягають інактивації. Клітинні стінки останніх

варіюють за товщиною від 3 нм до 40 - 80 нм, нараховують у складі до 100 шарів пептидоглікану. Подвійне покриття у 3 нм пептидогліканового шару створює реальні перешкоди дифузії фотосенсибілізаторів (для негативно заряджених та нейтральних речовин особливо). У цілому зазначені речі призводять до виразного гальмування процесів інактивації. Сприятливим моментом щодо подолання таких бар'єрів є обробка клітин етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА)/ поліміксіном В. Зазначені методологічні прийоми сприяють зростанню потенціалу проникливості цитоплазматичної мембрани та акумуляції у ній фотосенсибілізаторів [18, 26]. Отже, за лаштунками фундаментальних розробок стає цілком очевидною роль фотосенсибілізаторів як важливих елементів інактивації вірусів / бактерій. Оптимальний підбір якісних параметрів фотосенсибілізаторів (з урахуванням їхнього хімічного складу, концентрації, об'єму), застосовуваних режимів опромінення (довжина хвилі, потужність) створює перспективи ефективного інактиваційного впливу (на 8 lg). Клінічним прототипом верифікації даних за фотоінактиваційним впливом на вогнища субстратів (в умовах розвитку вірусних інфекцій) залишаються локалізації з подальшими регенераторними змінами у детектованих викиркозно-папульозних, виразкових осередках, локусах ранової інфекції [27]. На думку фахівців, добре відпрацьованими та екстраполятивно осмисленими є алгоритми опосередкованої фотодинамічної дії лазерного випромінювання з довжиною хвилі у 660 нм на тлі застосування метиленового синього (грампозитивні та грамнегативні бактерії). Інформативні аналізи колег містять дані на користь максимальних (≈ 5 lg) параметрів фотоінактивації клітин *Staphylococcus aureus* за концентрації метиленового синього 6-10 мкг/мл. У разі *Pseudomonas aeruginosa* (≈ 3 lg) зазначені показники отримували при 40 мкг/мл. Застосуванням ресурсів електронної мікроскопії була чітко підтверджена наявність пошкоджень оболонок вірусів / грампозитивних, грамнегативних бактерій після фотоінактивації з виходом клітинного вмісту та утворенням волокнистих структур. Посилення факторів фотодинамічної інактивації з якісними фотосенсибілізаторами сприяє синергізації ефектів [18]. Таким чином, фотоінактивація отримує статус ефективної неінвазивної фотодинамічної терапії. Застосування останньої є цілком доцільним за умов достеменного врахування відмінностей у динаміці фотоінактивації тих чи інших мікроорганізмів.

Дія фізичних факторів фотодинамічного впливу на життєздатність вірусів. Дослідження впливу поширених фізичних факторів на життєздатність вірусів сьогодні орієнтовані, перш за все, на певні типи опромінювання. Опромінювання не лише фактор інгібування, знищення вірусів, терапії захворювань, спричинених ними, але й доволі ефективний захід у дослідженні їхньої структурно-функціональної домінантності. Існують думки, що у вивченні вірусів, їхнього адаптаційного потенціалу до середовищних умов, радіобіологічні методи здобули

одне із найбільш доцільних застосувань. Мікроорганізми (віруси, у тому числі) піддавали впливу електромагнітного опромінення: інфрачервоного (від 3 000 000 до 7 600 Å), видимого (від 7600 до 4000 Å), ультрафіолетового, УФ (від 4000 до 130 Å). Науковій хроніці відомі дослідження щодо застосування рентгенівського опромінювання задля сприяння розвитку торпідності вірусів; короткохвильових високоенергетичних випромінювань радіоактивних речовин та таких, що отримані за умов сучасних прискорювачів. Грунтовні розробки за даною тематикою до тепер орієнтовані на екстраполяцію та моделювання процесів, зокрема, арсеналом та ресурсами бактеріофагів [28, 29, 30, 31].

Серед усіх відомих засобів фотодинамічної інактивації вірусів на сьогодні залишається найкраще дослідженим УФ опромінювання з доволі широким спектром впливу [28]. Дослідниками зауважується на те, що УФ сприяє не лише інактивації фагів, але й вирізняється позначеною генетичною дією, здатністю впливати на функціональні процеси та суттєво змінювати останні. Серед переліку властивостей згаданого фізичного фактору називають затримку/гальмування розмноження фагових часток, що вижили у наслідок опромінення; індукцію розвитку фагів у лізогенних бактеріях; стимуляцію генетичної рекомбінації, мутагенну дію. Окремі ефекти УФ впливу носять компенсований характер та за певних умов демонструють відчутний відновний потенціал (фотореактивація). Отже, можливості застосування УФ за для вивчення фотодинамічної інактивації доволі масштабні. Вони є надійною платформою у визначенні етапів внутрішньоклітинного розвитку фагів, біологічної стратегії онтогенезу, руйнацій серед головних елементів структурної організації вірусів.

Летальний вплив УФ анонсовано на початку двадцятих років (1922) минулого століття (д'Ерель, 1926). Перше кількісне дослідження із зазначеної проблеми оприлюднено Бейкером та Нанавутті у 1929 році. Науковцями було встановлено, що доки чисельність популяції не досягла 10^{-5} від первинного числа, інактивація являла собою експоненціальну функцію дози УФ променів. У 1934 році А. Гейтсом встановлено, що кінетика інактивації рухалась у відповідності до простого експоненціального закону. Вченим було застосовано монохроматор задля виділення лише однієї лінії спектру випромінювання. Згодом, використовуючи ресурси термодари, було визначено віддачу енергії джерелом опромінювання відповідно певній довжині хвилі. Останнє сприяло великою мірою усвідомленню спектру інактиваційної дії УФ. Зазначені дані прискорили висновки щодо фазного характеру об'єму низпадаючої енергії, важливої для інактиваційних процесів. Ці та подальші дослідження за фахом тематики показали, що спектри дії та спектри поглинання співпадають з типовим спектром поглинання очищених нуклеїнових кислот (нагадаємо – максимум становить 2600 Å). Можливо завдяки цьому інактивуючі фотони УФ променів поглинаються нуклеїновими кислотами. Надалі вдалось конкретизувати квантовий вихід енергії, необхідної для оптимальних режимів інактивації, за

умов експериментального застосування різних довжин хвиль. Згодом методологічний фундамент зміцнили дослідження фахівців, якими було з'ясовано, що експоненціальна функція дози власне й становить інактиваційний потенціал. Цікавими фактами озброїли науку розробки Лурія. Ними показано, що у мікроорганізмів, які вижили у наслідок застосування помірних доз УФ опромінення, латентний період позначено зростає. Останнє підтверджувало існуючі гіпотези щодо компенсованого характеру ушкоджень, викликаних поглинанням квантів енергії УФ. Стало зрозумілим, що УФ опромінювання спонукало розвиток вкрай поліморфних, з точки зору морфології, ушкоджень.

Гальмування/затримка розвитку/розмноження посилювались зі збільшенням дози УФ та не являлись спадковими, з урахуванням наявності нормального латентного періоду. До того ж, опромінювання вкрай неоднаково впливало на різні біологічні об'єкти [29-30]. Подальшими експериментальними дослідженнями були підтверджені науково-теоретичні припущення щодо здатності інактивованих та неспроможних до репродукції (відтворення) фагів вбивати чутливі до них бактеріальні клітини. Зрозумілою видається зацікавленість вірусологів даними фактами не лише, з огляду на перспективи експериментальної практики (зручна модель) вірусологічних досліджень, але й, з точки зору, пошуку та опрацювання способів отримання ефективних противірусних препаратів, вакцин. Визначення відсотку клітин, виживших після інфікування різною кількістю фагових часток, інактивованих УФ променями, надало усвідомлення цілковитої достатності адсорбції однієї опроміненої фагової частки задля ініціації загибелі клітини-хазяїна [31]. До того ж було показано, що інактивовані фаги зберігають певні властивості, що характерні властивостям активних фагів.

У свій час шокуючою видалась інформація, яка стосувалась феноменів відновлення життєздатності фагів видимим світлом. Згадані дослідження стимулювали сплеск повідомлень про фотокомпенсаторність уражень, які були викликані опроміненням різних біологічних об'єктів. Явище *фотореактивації* наявно продемонструвало власну спроможність за умов адсорбції фагів на чутливих бактеріях. Видимий спектр світла не реактивує неадсорбовані фаги та не сприяє розвитку фагів у бактеріях, підданих дії видимого спектру, перед їхнім зараженням цими фагами. Швидкість фотореактивації адсорбованих фагів залежить від температури (у разі її зростання збільшується вдвоє). Зазначені спостереження чітко висвітлюють залежність фотореактивації від окремих ферментних систем, існуючих у бактеріальній клітині, проте відсутніх у фагових частках. Останні факти слід застосовувати у експериментах з фотореактивацією у безклітинних бактеріальних екстрактах.

Радіація на фаги вірусів здійснює подвійну дію (пряму або непряму). Прямий ефект іонізуючого впливу відбувається за рахунок процесів поглинання фагами квантів енергії. Непрямий ефект зводиться до інактивуючої дії на фаг продуктів радіолізу

середовища. За спостереженнями фахівців, крива інактивації фагів за умов впливу іонізуючого випромінювання являє собою експоненту (підтвердження одноударного характеру інактивації). Доведено, що для інактивації однієї частки фагу формально достатньо одного акту іонізації. Різні фаги характеризуються різним рівнем чутливості до випромінювання. Найбільш уразливим структурним компонентом фагу являється його ДНК. Показано, що чутливість одного фага до іонізуючого впливу подібна чутливості фагів у заражених бактеріях/вірусах відразу після ін'єкції ДНК у клітину, тобто після вивільнення з білкової

оболонки. Радіорезистентність білків фагів доведена фактами збереження антигенних властивостей останніх. До того ж ультрамікроскопічні дослідження фагів, інактивованих гамма променями, показали структурну незмінність будови фагових часточок [32, 33].

Іншим відомим засобом інактивації є застосування ресурсів розпаду радіоактивного фосфору. У 1951 році авторитетні наукові шпальти запістрявили повідомленнями щодо втрати інфекційності бактеріофагів (T2, T4) завдяки розпаду радіоактивного фосфору, включеного до їхніх ДНК. Групами вчених було показано, що кінетика заявленої інактивації орієнтована на залишкову частину популяції. Вона становить експоненціальну функцію числа атомів, які розпалися за час експерименту. Швидкість інактивації пропорційна радіоактивності середовища, де відбувалось розмноження фагів та яке не залежить від концентрації фагів під час розпаду. Положення характеризувалось ймовірністю за умов збереження часток у достатньо високому розведенні середовища із захисними речовинами проти всілякої опосередкованої дії, що супроводжує радіоактивний розпад. Подальше вивчення процедурних моментів показало, що загибель кожної із радіоактивних фагових часток є наслідком розпаду одного із зосереджених у ній атомів. Дослідження швидкості інактивації та числа атомів, що розпалися у різний хронологічний проміжок (на одну фагову частину) дозволили розрахувати частку тих актів радіоактивного розпаду, що відбувались у фагових частках, які дійсно слугували причинами їхньої загибелі [32]. З'ясовано, що для фагів T2 і T4 вони становили близько 0,1. За цим ефективність убивчої дії така, що за даними перевірочних дослідів, акти іонізації, викликані бета-опромінюванням, не можуть бути головною причиною загибелі фагів. Причинами втрати інфекційності вважають такі безпосередні наслідки радіоактивного розпаду, як енергія віддачі, отриманої атомним ядром у разі розпаду. Пізніше Стентом та Фюрстом оприлюднені дані щодо ефективності вбивчої дії у площині співвідносності з концепцією Уотсона та Кріка. Згодом зазначеними фахівцями було висунуто гіпотезу щодо унеможливлення летальної дії значною частиною розпадів з причини фізіологічного стронгу макромолекули ДНК (збереження останньої було підтверджене навіть у результаті розриву однієї із двох полінуклеотидних ланцюгів. Подальші

фундаментальні дослідження за проблемою інактивації показали, що фагові частки, інактивовані за умов розпаду P^{32} , зберігають потенціал реактивації. Останнє стало об'єктивним підтвердженням концепції щодо спонукання летальним радіоактивним розпадом руйнацій лише частини вірусного геному. Реактивацію у результаті численних заражень у фагових часток, інактивованих у разі розпаду P^{32} , виявити не вдалось. Літична та лізогенезуюча здатність помірних фагів зникла під впливом розпаду P^{32} з однаковою швидкістю.

У відповідності до існуючих на сьогоднішні даних, лізис інфікованих клітин (чутливих на тлі надмірної кількості бактеріофагу та високих темпів інфікування [34]) добре візуалізований арсеналом засобів світлооптичної мікроскопії. Головні етапи лізису розгортались після латентного періоду, властивого даному температурному режиму та умовам живлення клітини. Період часу, необхідний для лізису бактерій, відповідав проміжкам, необхідним для вивільнення фагів за одиничний цикл розмноження, що наводило дослідників на думку, відносно співпадіння лізису з вивільненням зрілих часточок фагів. Головним наративом зазначеного було пригнічення подальшого розподілу клітин інфікуванням. Переважна більшість випадків свідчила на користь відсутності змін. Цитологічні перебудови (набухнення, балонна дистрофія, отримання сферичної форми) випереджали розриви клітин. Деколи структурна специфіка клітини відповідала витягнутій, ниткоподібній просторовим комбінаціям. Якісні зміни клітин за умов фагової агресії були пов'язані суто з інфекціями. У разі переваги зазначеної версії патогенетичного сценарію відбувався «лізис із - зовні». Останній унеможлилював вивільнення життєздатних часток фагів. За таких умов на тлі середньої численності фагів популяція клітин піддавалась лізису з нормальним виходом фагів. Дослідження фіксованих та забарвлених препаратів клітин з ознаками фагового впливу, демонстрували позначену дезорганізацію ядер з маргіналізацією хроматина, акумуляцією клітинами гетерохроматину. За цим просторова конфігурація клітини практично не змінювалась. Однак, випадки набухнення, каріопікнозу, рексису ядер інколи спостерігали. Отриманню технічно якісних, з точки зору, гістологічної детекції препаратів, сприяли класичні барвники. Ресурсами останніх відбувалась диференціація оболонок клітин, їхньої цитоплазми [22-23]. Характеристику хроматину отримували за лаштунками методики Гімзи. Агрегація хроматину клітин-хазяїна, його міграції та маргіналізації сприяв ультрафіолет. Цікавою, на наш погляд, була думка фахівців щодо агрегація хроматину як першої детектованої стадії інфекції. Окрім цього, дослідженнями, орієнтованими на вивчення ультраструктури інфікованих клітин, вдалось виявити зрілі фагові часточки з невеликою кількістю речовини вірусного походження. Морфологічна детекція за умов стандартних прийомів інактивації надавала цілісну панораму клітинних розладів не лише тих, що відбувались у ядерному апараті уражених/інфікованих клітин, але й цитоплазматичному, зокрема. На тлі

зазначених процесів у клітинах диференційно можливими виявились мітохондрії (навіть за умов інтенсивних руйнацій ядерного апарату та акумуляції клітиною фагових часточок).

Фундаментальні аспекти розв'язання складної та багатогранної проблеми інактивації вірусів (фотодинамічної як приклад) невід'ємним чином пов'язані із маркерами ефективності. Серед провідних переважна більшість вчених називає *імунні ресурси хазяїна*.

Імунні ресурси хазяїна відомі своїм глибоким еволюційним корінням, що тисячоліттями формувалось у процесі природного відбору, та націлені на захист хостерних клітин від широкого спектру метаболітів/метаболітичних комплексів, патогенів, вірусних, у тому числі [35]. Сутність імунної відповіді полягає у інактивації вільного вірусу та заражених клітин, здатних до його виділення у зовнішнє середовище. Згадані процеси унеможливаються торпідною поведінкою В-клітинної ланки імунної системи, з якою, власне, і пов'язують цілковиту реалізацію імунної відповіді (за рахунок продукції нейтралізуючих антитіл) [36]. Біологічною задачею антитіл, направлених проти поверхневих антигенів, залишається продуктивне зниження інфекційності вірусу та сприяння агрегації віріонів з подальшою утилізацією останніх із кровообігу. Кожен із етапів: нейтралізація, агрегація, утилізація віріонів, пов'язаний із компліментом. Антитіла разом із ним лізують віруси, їхні мембрани, у решті решт, унеможливаючи інфекційність останніх. Характеризуючи комплімент, слід згадати його здатність лізувати віруси з їхніми оболонками навіть за умов відсутності антитіл. Виходячи із зазначеного вище, стає зрозумілим, що застосування фізичних факторів інактивації вірусів (ультрафіолетового, іонізуючого, лазерного опромінювання) нерозривно пов'язане із низкою кардинальних біологічних питань: роль та значення компліментзв'язуючої системи, клітинного імунітету, власне, морфологічних домінант вірусів та їхнього життєвого циклу [1-3, 29, 36]. Віруси, що дозрівають на клітинній поверхні шляхом брунькування та / або не містять ліпідів, активно імплантують у клітинну мембрану власні протеїни, формуючи у інфікованої клітини сенситивність до лізису. Найважливішими серед них є аспекти, пов'язані з індукцією цитостатичних Т-клітин, здатних розпізнавати антиген у комплексі з антигенами гістосумісності класу I. Згадана стратегія, до речі, яскраво доводить актуальність застосування мікроскопічних методів верифікації параметрів ефективності застосовуваної у експериментах фотоінактивації [14]. Зазначені факти є тим унікальним випадком, де стандартно проведені клінічні дослідження суттєво допомагають фундаментальним дослідженням (одужання пацієнтів). Специфічно сенсibilізовані Т-клітини у разі взаємодії з клітинами, зараженими вірусом, здатні вивільняти гамма-інтерферон [3]. Останній сприяє процесам одужання. Цитофільні антитіла спонукають подальшу соматичну резистентність до вірусного інфікування, разом із компліментом лізують інфіковані

вірусом клітини. Первинна резистентність до повторної інфекції зумовлена, головним чином, антитілами, налаштованими на вільний вірус. Поява та розвиток інфекції сама по собі являється фактором стимуляції імунних механізмів лізису. Отже, представлений сценарій, у решті решт, орієнтує на попередження захворювання, прискорення одужання та обмежує розмноження вірусів. Слід зауважити, щодо відсутності цілковитого розуміння механізмів імунітету, які сприяють зміцненню резистентності до вірусної атаки. Однак для ефективної імунопрофілактики (фотодинамічна інактивація вірусів є одним із таких заходів) очевидно необхідна стимуляція комплексних реакцій за умов їх апробованих співвідношень [4-6]. Отже, імунні механізми, що сприяють знищенню вірусів у інфікованих ними клітинах, можуть бути застосовуваними у сучасних алгоритмах з фотоінактивації вірусів (як імуностимулюючого фактору) завдяки арсеналу В-клітинної ланки імунітету, яка здійснює продукцію нейтралізуючих антитіл.

Висновки. Успішне розв'язання проблеми фотоінактивації вірусів однозначно зосереджене у площині всебічного усвідомлення біологічної сутності останніх, провідних аспектів їхньої ідентифікації, характеристик, метаболізму та участі хостерних клітинних структур. Фотодинамічна інактивація є містким багатокомпонентним процесом (видимий спектр світла, ультрафіолетове, іонізуюче, радіоактивні елементи: фосфор) задля ефективної реалізації якого вкрай необхідні комплексні підходи та асортимент «стимуляторів» (фотосенсибілізатори). Фотоінактивація неможлива без базових маркерів ефективності (на кшталт імунних ресурсів хазяїна) та урахування потенційних компенсаторних реакцій (фотореактивації, зокрема).

Подяка

Автори статті висловлюють щирі вдячності нашим консультантам з питань фармацевтичної хімії та імунофармакології: співробітникам лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології; натхненниці дослідження, завідувачці лабораторії вірусних інфекцій д. мед. н, с. н. с. пані Світлані КАЛІНІЧЕНКО, завідувачці наукової бібліотеки Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України пані Тетяні РЕЗАК за цінну технічну допомогу під час пошуку актуальних тематичних джерел наукової літератури).

Photodynamic inactivation of viruses. Prototypes. Understanding and grounding

Torinyk I. I., Minukhin V. V., Melentyeva K. V., Moiseienko T. M., Khrystian G. Ye., Melnyk A. L., Bolshakova G.M.

Introduction. Discussions around the problem of photodynamic methods of virus inactivation, considering the effectiveness of using their most verified results in the creation of vaccines (live, inactivated, subunit, recombinant, synthetic; toxoids), orient the scientific

community to a detailed analysis and non-pragmatic objectification of key prototypes as means scientific and theoretical grounding of issues by topic. The leading prerogative of such an approach (meta-analytical) is the aggregation of information to a higher degree of statistical power, greater assessment reliability than can be obtained from the results of individual studies. The study of abstract analyzes (retrospective, including) based on the results of photodynamic inactivation of viruses with the aim of applying the obtained phenomena for the creation, testing and production of vaccines showed the presence of a small number of sources on the search topic (both in Ukraine and abroad). Taking a careful approach to the tasks and being aware of the fact that it is impossible at this stage to develop a unified assessment that is close to the general truth that is little known to us today (the production of vaccines by photodynamic inactivation methods), the analysis of the specific problems of scientific sources was carried out on several hundred informative annals. In accordance with the given search parameters, the principles recommended by the compilers of the Cochrane Collaboration were followed, using a combination of evidence / information from qualitative studies, for the evidential context of systematic reviews (by prototypes: viruses, identification, characterization, metabolism and cellular structures; inactivation; photodynamic methods; vaccines. By the way, a successful solution to the problem of photoinactivation of viruses is unequivocally focused on the plane of comprehensive awareness of the biological essence of the latter). **Purpose:** to conduct an analysis of modern and retrospective analyzes of reference sources regarding the problem of photodynamic inactivation of viruses and the subsequent application of the results for the creation of vaccines. **Materials and methods.** The material of the study was the reference annals (retrospective, including), archives, copies of laboratory samples based on the results of photodynamic inactivation of viruses with the aim of applying the obtained phenomena for the creation, testing and production of vaccines. The scope of the study was completed with data from many years of development (primary material from experimental studies, copies of excerpts from reports; fragments-sections of current research works on the problem of photoinactivation of viruses on the bacteriophage model), obtained in the laboratory of viral infections of the State Administration "Institute of Microbiology and Immunology named by I.I. Mechnikov of National Academy of Medical Sciences of Ukraine" (2021-2023). In order to objectify the work, an extended analytical review of thematic sources of scientific-theoretical, methodological, patent information was conducted (according to the key prototypes specified above). The search was conducted using the databases of bibliographic resources of search engines "Google", "Yandex", "Rambler" and others. **Results& Discussion.** The authors note that the identification of viruses contributes to the application of refined photoinactivation algorithms, obtaining decisive results in terms of qualitative and quantitative parameters. It is an obvious factor in the objectification of the latter. Virus identification is the basis of thorough data verification. One of the pragmatic

goals of the universal taxonomic system (UTS) is the identification of viruses. Despite the fact that it is built on conventionally chosen hierarchical levels (family, genus, species, strain, variant), the adjective "unequivocal" is firmly implanted in the term "identification". The brevity of the UTS does not prevent researchers from indicating the belonging of each of the viruses used in scientific development to the appropriate taxon. Characteristics of viruses are obtained due to visualization and the results of ultramicroscopic studies using negative contrast, serological methods, determination of resistance to various factors (changes in pH, temperature, effects of certain types of solvents (lipids), etc.). An important integral parameter remains the morphology of the virion. The specified identification and characterization have proven effectiveness over the years, which contributes to the optimal selection and support of experiments on photoinactivation of viruses and their extrapolations into practice. The article emphasizes that the accumulated data on metabolism and cellular structures testify in favor of the implementation of several cardinal principles of detection of inhibitory properties of physicochemical (photodynamic, including) effects on viruses. Studies of the common physical factors affecting the viability of viruses today are focused, first of all, on certain types of exposure. Irradiation is not only a factor of inhibition and destruction of viruses, but also a rather effective measure in the study of their structural and functional dominance. It is shown that in the study of viruses, their adaptation potential to environmental conditions, radiobiological methods have acquired one of the most appropriate applications. Research on the use of X-ray irradiation to promote the development of torpidity of viruses is known to the scientific chronicle; short-wave high-energy radiations of radioactive substances and those obtained under the conditions of modern accelerators. Solving the complex and multifaceted problem of virus inactivation (photodynamic as an example) is inextricably linked to the use of the host's immune resources. The authors analyzed the results of the use of model bacteriophages, showed the prospects of the specified methods. The article also emphasizes the photodynamic inactivation of viruses as one of the ways to obtain vaccine preparations. **Conclusions.** A successful solution to the problem of photoinactivation of viruses is clearly focused in the plane of comprehensive awareness of the biological essence of the latter, leading aspects of their identification, characteristics, metabolism and participation of host cell structures. Photodynamic inactivation is a comprehensive multicomponent process, for the effective implementation of which complex approaches and an assortment of "stimulators" are extremely necessary. Photoinactivation is impossible without basic efficiency markers and consideration of potential compensatory reactions.

Key words: viruses, identification, characterization, metabolism and cellular structures; photodynamic inactivation, methods, photosensitizers, photoreactivation; lysis; immune resources of the host.

References:

- Wiehe A., O'Brien J.M., Senge M.O. Trends and targets in antiviral phototherapy. *Senge Photochem Photobiol Sci*. 2019. 1.18(11).2565-2612. doi: 10.1039/c9pp00211a.
- Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May. 3(5).406-11. doi: 10.1039/b311903n.
- Aroso R.T., Schaberle F.A., Arnaut L.G., Pereira M.M. Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases. *Photochem Photobiol Sci*. 2021. 20(11).1497-1545. doi: 10.1007/s43630-021-00102-1
- Wainwright M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2003. 21 (6). 510-20. doi: 10.1016/s0924-8579(03)00035-9.
- Hamblin M. R. Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004. 3 (5). 436-450.
- Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016. 33. 67-73. doi:10.1016/j.mib.2016.06.008.
- Scheller C, Krebs F, Minkner R, Astner I, Gil-Moles M, Wätzig H. Physicochemical properties of SARS-CoV-2 for drug targeting, virus inactivation and attenuation, vaccine formulation and quality control. *Electrophoresis*. 2020.41(13-14).1137-1151.
- Zanella P.A., Onuchic L.F., Watanabe E.H., Azevedo L.H., Aranha A.C., Ramalho K.M., Eduardo C.P. Photobiomodul Photomed Laser Surg. 2022. (10):682-690. doi: 10.1089/photob.2022.0054. Epub 2022 Oct 10. PMID: 36219750.
- Mariewskaya K. A., Krasilnikov M. S., Korshun V. A., Ustinov A. V., Alferova V. A. Near-Infrared Dyes: Towards Broad-Spectrum Antivirals. *Int J Mol Sci*. 2022. 22. 24(1).188. doi: 10.3390/ijms24010188
- Littler E.I. The past, present and future of antiviral drug discovery. *Drugs*. 2004. 7(12). 1104-12.
- European Centre for Disease Prevention and Control. URL: http://www.Ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
- A service of the U.S. National Institutes of Health. URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00663091?term>.
- Brovko L. Photodynamic treatment: a new efficient alternative for surface sanitation. *Adv Food Nutr Res*. 2010.61.119-47. doi: 10.1016/B978-0-12-374468-5.00003-9. PMID: 21092903.
- Szpringer E., Lutnicki K., Marciniak A. Photodynamic therapy-mechanism and employment. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med*. 2004.59(2).498-502
- Nakamichi K, Shimokawa T. Database and Statistical Analyses of Transcription Factor Binding Sites in the Non-Coding Control Region of JC Virus. *Viruses*. 2021. 19.13(11).2314. doi: 10.3390/v13112314.
- Mitton D., Ackroyd R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008; 5(2):103-11. doi: 10.1016/j.pdpdt.2008.04.004. Epub 2008 Jul 7
- Radchenko O.S., Stepura L.G., Gamaliya M.F. Photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria *in vitro* using methylene blue photosensitizer. *Photobiology and experimental photomedicine*. 2016. Vol. 12. № 1,2. P. 29-33.
- Mariewskaya K.A., Tyurin A.P., Chistov A.A., Korshun V.A., Alferova V.A., Ustinov A.V. Photosensitizing Antivirals. *Molecules*. 2021 29. 26(13). 3971. doi: 10.3390/molecules26133971.
- Roberts R., Styrt B., McCune S. FDA perspective on antivirals against biothreats: communicate early and often. *Antiviral Res*. 2008 Apr. 78(1). 60-3. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.10.001.
- Shubuladze A. K., Gaidamovich S. Ya. A short course in practical virology. Ed. 2, revis. and suppl. *Medgiz*. 1954. 380 p.
- General Virology: A Guide. Vol. 1. Ed. by V. M. Zhdanov, S. Ya. Gaidamovich. 1982. 496 p., ill.
- Virology: In 3 volumes. T.1: Per. English. Ed. by B. Fields, D. Knipe, with the participation of R. Chenok, B. Roizman, J. Melnik, R. Shoup. Wold, 1989. 492 p., ill. ISBN 5-03-000283-9.
- Sanchez E. L., Lagunoff M. Viral activation of cellular metabolism. *Virology*. 2015. Vol. 479-480: 609-618.
- Nazarian R.S., Spiridonova K.Yu., Piontovska O.V. Photodynamic Therapy: From the Antiquity to the Present Literature Review. *Dental News*. 2015. 3 (84). 66-70.
- Wiehe A., O'Brien J. M., Senge M. O. Trends and targets in antiviral phototherapy. *Photochem Photobiol Sci*. 2019. 1;18(11):2565-2612. doi: 10.1039/c9pp00211a.
- Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016. 473(4). 347-364. doi:10.1042/BJ20150942.
- Zanella P. A. Photobiomodulation for Preventive Therapy of Recurrent Herpes Labialis: A 2-Year *In Vivo* Randomized Controlled Study. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2022. 40 (10). 254-267.
- Barbora A. Targeted antiviral treatment using non-ionizing radiation therapy for SARS-CoV-2 and viral pandemics preparedness: Technique, methods and practical notes for clinical application *PLoS One*. 2021. 16(5). 334-342. doi:10.1371/journal.pone.0251780
- Bianco A., Biasin M., Pareschi G., et al. UV-C irradiation is highly effective in inactivating and inhibiting SARS-CoV-2 replication. 2020. SSRN.
- Fracella M., Leonardo M., Sorrentino A. Ingenito R., Gentile M., et al. *In Vitro* Virucidal Effects of Ultraviolet Light Prototypes on RNA viruses. *New Microbiol*. 2023. 46(2).161-169.
- Toranyk I.I. Kalinichenko S. V., Martynov A. V., Minukhin V. V., Moiseenko T. M., Melent'eva Kh. V. Methodological concepts of the inactivating effect of ultraviolet irradiation on bacteriophage as a model object (analysis of previous experience). From Experimental and Clinical Pathophysiology to the Achievements of Modern Medicine and Pharmacy: Materials of the V Scientific and Practical Conference of Students and Young Scientists

with International Participation. Kharkiv. May 18. 2023. P. 44.

32. Afrough B., Eakins J, Durley-White S., Dowall S. Carter & Roger Hewson X-ray inactivation of RNA viruses without loss of biological characteristics. Scientific Reports. 2020. 10 (1). 214-219.

33. Torianyk I. I., Kalinichenko S. V., Martynov A. V., Minukhin V. V., Moiseenko T. M., Melent'eva Kh. V. Analysis of the photo-inactivating effect of ionizing radiation on bacteriophage as an viral experimental model. From Experimental and Clinical Pathophysiology to the Achievements of Modern Medicine and Pharmacy: Materials of the V Scientific and Practical Conference of Students and Young Scientists with International Participation. Kharkiv. May 18. 2023. P. 43.

34. Santos P., Gomes A., Lourenço L., Faustino M. Neves and Adelaide Almeida Anti-Viral Photodynamic Inactivation of T4-like Bacteriophage as a Mammalian Virus Model in Blood Int. J. Mol. Sci. 2022. 6(23). 1164-1188. <https://doi.org/10.3390/ijms231911548>

35. Isayenko O. Y., Knysh O. V., Kotsar O. V., Ryzhkova T. N., Dyukareva G. I.. Simultaneous and sequential influence of metabolite complex of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* and antibiotics against polyresistant Gram-negative bacteria. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2020. 11(1). P. 139-145. <https://doi.org/10.15421/022021>.

36. Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology. 2018. 584 p.