

## СУЧАСНІ МЕТОДИ РОЗРОБКИ ВАКЦИН: ДОСЛІДЖЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ІНАКТИВАЦІЇ

Христина Мелентьєва, Артур Мартинов,  
Світлана Калініченко,  
Тетяна Антушева, Петро Оветчин

Інститут мікробіології та імунології імені  
І.І. Мечникова НАМН України

На даний час існує актуальна проблема розробки гіпоалергенних і неактогенних вакцинних препаратів новітнього класу, що сприятиме створенню популяційного імунітету проти багатьох інфекційних хвороб у всіх прошарків населення та значній економії бюджетних коштів. WHO визначила одним з пріоритетних напрямків заміну парентеральних вакцин на непарентеральні, які базуються на здатності антигенів проникати крізь слизові оболонки. Найбільш перспективними з них є мукозальні вакцини, застосування яких дозволяє забезпечити безперервний антигенний стимул та підтримувати на високому рівні колективний імунітет проти інфекцій, керованих засобами специфічної профілактики, в тому числі і COVID-19.

На теперішній час для інактивації вакцинних антигенів застосовуються токсичні речовини, на кшталт, формаліну та мертіолату, які вступають в хімічну реакцію з антигеном та змінюють його імуногенність. Таким чином, окрім інактивації патогенів, ці речовини зменшують їх специфічну імуногенність інколи до 100 разів, збільшуючи їх реактогенність та алергенність за рахунок появи аномальних антигенних детермінант після ковалентної реакції з інактиваторами.

Як показують багатолітня практика живих вакцин мають ряд як позитивних, так і негативних властивостей. Поряд з генетично закріпленою втратою патогенних властивостей вакцинні штами здатні розмножуватися в місці введення, лімфовузлах і внутрішніх органах. Вакцинна інфекція не супроводжується клінічною картиною захворювання, але призводить до формування міцного і тривалого імунітету, подібного постінфекційному. На жаль, живі вакцини важко дозуються і піддаються біоконтролю. Вони вкрай чутливі до дії високих температур і вимагають неухильного дотримання холододового ланцюга. Крім того, жива вакцина, зазвичай, містить велику кількість (до 99%) баластних структур, що може призводити до підвищення реактогенності. Також, не можна не звертати увагу на можливість реверсії вірулентних форм, що може стати причиною захворювання пацієнта, що вакцинується. Задля достатньої безпеки живих вакцин необхідно мати генетично стабільний гомогенний атенуований штам і проводити постійний контроль на реверсію вірулентності збудника [1].

Для забезпечення надійної інактивації і мінімального пошкодження структури антигенів,

вакцини збудників позбавляють вірулентних властивостей шляхом нагрівання, обробки формаліном, ацетоном, спиртом та ін. Але в результаті процесу інактивації імуногенність таких вакцин зменшується на порядки. Ліофільне висушування вакцин забезпечує високу стабільність препаратів і знижує концентрацію деяких домішок, але при цьому знову ж імуногенність вакцин зменшується на порядки.

Відомо, що при виробництві інактивованих вакцин необхідно особливу увагу звертати на повноту інактивації вакцин. Інактивовані вакцини в цілому менш ефективні, ніж живі, однак при повторному введенні створюють досить стійкий імунітет. Субодичні і спліт-вакцини мають низьку реактогенність, високу ступінь специфічної безпеки і достатню імуногенну активність. Для приготування таких вакцин, використовується вірусний лізат, який отримують зазвичай за допомогою детергента, для очищення матеріалу застосовують різноманітні методи, що дозволяє домогтися високого ступеня очищення (> 95%). Використання ад'ювантів дозволяє помітно підвищувати ефективність цих вакцин.

Ще одним варіантом вакцин є анатоксини, які забезпечують формування антитоксичного імунітету (індукування синтезу антигін проти анатоксинів) однак не запобігають бактеріоносійству. Це екзотоксини різних мікроорганізмів, інактивовані формаліном. Такі вакцини зазвичай сорбують на гідроксиді алюмінію.

Рекомбінантні вакцини можуть бути використані для розробки комплексних вакцин, що створюють імунітет одночасно проти декількох інфекцій. Для отримання використовують високоефективну сучасну генну технологію з застосуванням генно-інженерних продуктів. Рекомбінантні вакцини дуже ефективні та безпечні але швидка мутація інфекційного чинника в природі призводить до швидкої втрати їх ефективності. Це є причиною відмови виробників (наприклад, грипозних вакцин) від генно-інженерних антигенів і застосування класичних методів з актуальними штамми вірусів. Широко використовують комбіновані вакцини, які забезпечують вироблення протективного імунітету проти кількох інфекцій. Серед них, відома АКДП-вакцина, що складається з інактивованих бактерій *Bordetella pertussis* і очищених дифтерійного та правцевого анатоксинів, адсорбованих на гідроксиді алюмінію [2].

На відміну від живих і цілюноклітинних вакцин, рекомбінантні, синтетичні і інактивовані вакцини характеризуються недостатньою імуногенністю. Це є основною проблемою при їх використанні на даний час. Відомо, що інактивація патогену та/або токсина формаліном чи пропіолактоном призводить не тільки до зменшення на порядки їх імуногенності, але завдяки утворенню ковалентних зв'язків між формаліном та білками токсинів, з'являються нові небажані аномальні антигенні детермінанти, які збільшують

реактогенність та алергенність таких вакцин. Задачею дослідників на даний час є виключення вказаних вище недоліків шляхом запобігнення утворення ковалентних зв'язків між модифікатором та антигеном - мішенню – токсином або збудником. При цьому інактивація повинна залишатися вельми ефективною.

Відомо, що рибофлавін є активатором клітинного метаболізму у людей та тварин, але окрім своєї ключової ролі, він виступає як фотосенсибілізатор і використовується в системах дезінфекції, що забезпечує антимікробну дію. Метод дезінфекції, при якому застосовується фотосенсибілізатор, називається антимікробною фотодинамічною терапією.

### **Антимікробна фотодинамічна терапія як система інактивації патогенів**

На цей час встановлено, що системи інактивації патогенів (СІП) в препаратах крові є ефективними проти численних бактерій, вірусів і паразитів та широко застосовуються в технологіях знезаражування продуктів крові в трансфузіології. Ці передумови дали нам ідею про екстраполяцію досвіду трансфузіологів з фотодинамічної інактивації препаратів крові на вакцинологію з метою заміни інактиваторів/консервантів на нетоксичні метаболітні засоби фотоінактивації, від яких не потрібно очищувати вакцину та які не утворюють ковалентних зв'язків з антигенами вакцин.

Антимікробна фотодинамічна терапія (aPDT) є перспективним підходом щодо фотоінактивації збудників у крові та похідних крові. Перевага антимікробної фотодинамічної терапії полягає в тому, що до неї не існує стійких штамів. Є три затверджені фотосенсибілізатори на сьогодні: метиленовий синій (МВ) для плазми та рибофлавін і амотосален для плазми та тромбоцитів [3].

### **Фотодинамічна терапія (aPDT) та її механізми**

Як відомо, молекула фотосенсибілізатора (PS) у своєму основному стані є синглетом, оскільки вона має два електрони з протилежними спінами. При поглинанні фотона світла ( $h\nu$ ) з відповідною квантовою енергією тобто з відповідною довжиною хвилі відбувається збудження одного електрона на більш енергійну орбіталь. В збудженому стані цей синглетний PS нестійкий і втрачає надлишок енергії у вигляді випромінювання світла (флуоресценція), або тепла (внутрішнє перетворення). Також можливо, що збуджений синглет PS зазнає процесу, відомого як "міжсистемний перетин", завдяки якому утворюється більш стабільний збуджений триплетний стан з паралельними спінами. Молекула PS триплетного стану може розпадатися назад до основного стану, випромінюючи фосфоресцентний фотон, але за

правилами квантового відбору це "заборонений процес", тому триплетний стан набагато стабільніший, ніж синглетний стан, який має тривалість життя мікросекунди порівняно з лише наносекундами для збудженого синглета. Завдяки довгому життю триплетного стану може відбутися передача своєї енергії, при зіткненні з молекулярним киснем ( $O_2$ ), який унікальний тим, що є молекулярним триплетом у основному стані. Цей етап передачі енергії призводить до утворення синглетного кисню ( $^1O_2$ ) і основного PS. Така реакція називається фотохімічним процесом типу II.

Також може відбуватися фотохімічний процес типу I, при якому PS у збудженому стані піддається реакціям переносу електронів, що з часом утворює активні форми кисню (АФК). Механізм цей може включати отримання, або донорство електрона з утворенням радикального катіона або радикального аніона. При реакції радикального аніону з киснем, утворюється супероксидний радикальний аніон ( $O_2 \cdot^-$ ). Одноелектронне відновлення  $O_2 \cdot^-$  - дисмутація призводить до утворення пероксиду водню ( $H_2O_2$ ), який, у свою чергу, може зазнати іншого одноелектронного відновлення, утворюючи потужний окислювач - гідроксильні радикали ( $HO \cdot$ ). Генерація АФК за допомогою механізму типу II набагато простіша, ніж за допомогою типу I. Вважається, що більшість PS, які використовуються, наприклад, у протираковій фотодинамічній терапії, працюють за допомогою типу II, а не механізму типу I (рис. 1) [4, 5].

До фотомодифікації також спроможні флавіни завдяки своїй здатності переносити заряд при поглинанні фотонів, що опосередковує клітинні сигнали або експресію генів в ендогенних білкових комплексах, таких як домени, що сприймають систему світло-кисень-напруга у бактерій і рослин [6]. Біологічно нерегульований фотонно-збуджений стан флавінів в ультрафіолетово-синій (УФ-синій) спектральній смузі у той же час може призвести до утворення або синглетного кисню ( $^1O_2$ ) через перенесення енергії до кисню навколишнього середовища (тип II), або водню пероксиду та похідних за допомогою радикалізації (тип I) (АФК).

Ендогенні фотосенсибілізатори, такі як порфірини або флавіни, які природно присутні в бактеріях і грибах, що поглинають це видиме світло і згодом генерують активні форми кисню, такі як  $^1O_2$ ,  $OH$  або  $H_2O_2$ . Ці внутрішньоклітинні активні форми кисню атакують ДНК, білки або мембрани і, якщо ушкодження стає занадто великим, клітина гине. Клітини людини також містять такі фотосенсибілізатори, але, проте, вони виявилися дуже стійкими до видиме світло [7 – 16].

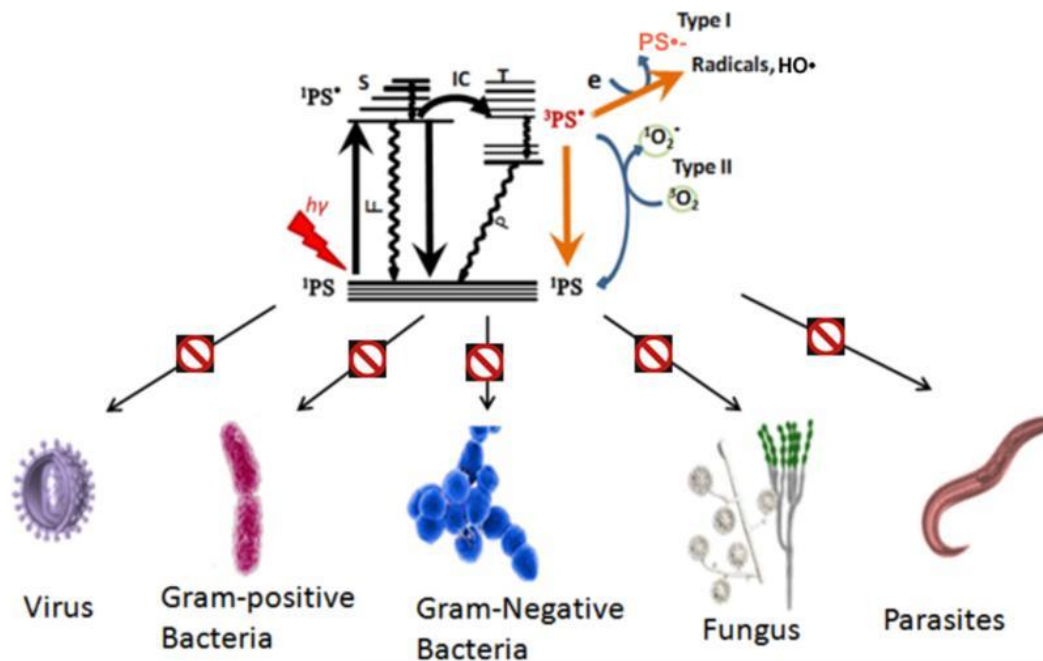


Рисунок 1. Діаграма фотохімічних шляхів в aPDI Яблонського. Основний стан  $^1PS$  (фотосенсибілізатор) поглинає фотон, утворюючи збуджений синглетний стан  $^1PS^*$ , який може зазнати міжсистемного схрещування (IC), утворюючи триплетний стан  $^3PS^*$ . Цей довгожителю може переносити енергію (тип II) з утворенням із молекулярного кисню  $^3O_2$  синглетного кисню  $^1O_2^*$  або перенесення електронів (тип I) з утворенням гідроксильних радикалів  $HO \cdot$ . Обидва ці АФК здатні вбивати широкий спектр патогенів

**Рибофлавін як ланка фотодинамічної інактивації патогенів.** Відомо та давно використовується антибіотикогенна властивість рибофлавіну для противірусної та антибактеріальної дезінфекції. Завдяки наявності різних мезоатомів рибофлавін має чудові фотофізичні та фотохімічні властивості. Це доводять експериментальні дослідження, за якими видно, що фотоактивований рибофлавін виробляє АФК [17, 18]. Наприклад при фоторефракційній хірургії для зміцнення тканини рогівки за допомогою ROS-індукованого зшивання колагену [19, 20].

Рибофлавін зазнає міжсистемного перетворення із синглетного стану в триплетний при поглинанні фотону після опромінення світлом. Цей триплетний стан реагує з молекулярним киснем, утворюючи тим самим АФК. Згенерований АФК атакує клітинні макромолекули і руйнує цілісність мембрани, тим самим вбиваючи мікроорганізм.

На даний час існує декілька відомих досліджень, присвячених рибофлавіну. За одним з них рибофлавін опромінювали білим світлом протягом 2 год, за допомогою дослідної моделі з кишковою паличкою. Оброблені бактеріальні клітини демонстрували різне внутрішньоклітинне утворення АФК і помітне збільшення рівня маркерів окисного стресу - перекисного окислення ліпідів (рівня малонового діальдегіду, MDA) та окислювальних модифікацій білків (рівня карбонілювання амінокислот білків, PCA), а також значне зниження активності лактатдегідрогенази (LDH). Було

зафіксовано помітне зменшення колонієутворюючих одиниць *E. coli*, що було підтверджено додатково оптичними мікроскопічними та SEM-зображеннями шляхом реєстрації загибелі бактерій. Тобто, був продемонстрований антимікробний фотодинамічний потенціал рибофлавіну дослідженнями Khan S. та співавторів. Фотоосвітлений рибофлавін перетворює окислювально-відновний статус бактеріальних клітин у скомпрометований стан, що призводить до пошкодження мембрани, що в кінцевому підсумку спричинює загибель бактерій. При порівнянні активності супероксиддисмутази (SOD) та каталази у зразках, які піддавалися фотоосвітленому рибофлавіну і при дії рибофлавіну без світла та впливу лише світла, зясували, що їх активність істотно знижена порівняно із зразками, які піддавалися впливу і рибофлавіну і світла. Зниження рівня клітинного антиоксидантного метаболіту - глутатіону (GSH) значно зменшилось у зразках, що зазнали дії фотоосвітленого рибофлавіну. Специфічна активність глутатіон-S-трансферази (GST) - GSH (який бере участь у процесі детоксикації), суттєво зросла в клітинах, що зазнали впливу збудженого світлом рибофлавіну. Це дослідження елюструє ще один пріоритет до використання фотоактивованого рибофлавіну, який генерує чутливість клінічно важливих мультирезистентних бактерій до АФК [21].

Дослідженнями Maisch T. та співавторів доведено, що синтезовані похідні флавіну можуть бути використані як фотосенсибілізатори для місцевого застосування для деколонізації бактеріями шкіри та

слизової оболонки. В експериментах був показаний високий квантовий вихід синглетного кисню. Приблизно 75 % при використанні синтезованих похідних флавіну. Високорезистентні бактерії, такі як MRSA (стійкий до метициліну золотистий стафілокок), ЕНЕС (ентерогеморагічна кишкова паличка), синьогнійна паличка та *Acinetobacter baumannii*, інкубували з похідними флавіну *in vitro* і згодом опромінювали видимим світлом лише протягом декількох секунд. Бактерицидна дія фотоактивованого рибофлавіну не залежала від типу бактерій та їх стійкості до антибіотиків. Після опромінення кількість життєздатних бактерій значно зменшувалась (до  $6 \log_{10}$ ) залежно від концентрації похідних флавіну та світлового дозування. В той же час життєздатність клітин кератиноцитів людини не змінювалась під впливом різних концентрацій фотосенсибілізатора та параметрів світла, що використовуються для знищення бактерій (терапевтичне вікно). Таким чином, дослідження показує, що мультирезистентні бактерії можна безпечно та ефективно знищувати комбінацією модифікованих молекул вітаміну B2, кисню та видимого світла, тоді як нормальні клітини шкіри виживають [22].

В декількох дослідженнях була показана здатність рибофлавіну, активованого синім світлом вбивати патогени. Thakur P. та співавтори показали вразливість *S. aureus* та *P. aeruginosa* [23], а O'Rourke J. *Bacillus subtilis* перед фотоактивованим рибофлавіном [24].

У дослідженнях Makdoui K. та співавторів рибофлавін посилював антибактеріальну дію на дослідний штаб MRSA при двох різних довжинах хвиль синього світла - 412 та 450 нм. При використанні вищої дози, КОЕ зменшувалось у 99 % та 98 % відповідно для довжини світла 412 та 450 нм. Бактерицидна ефективність була високою також у глибшому шарі рідини (93 %, вища доза). Ці та інші результати свідчать про те, що синє світло можна розглянути для використання при розробці методики лікування глибоких інфекцій рогики [25].

Також було показано, що рибофлавін / УФА та попередня обробка амфотерицином В ефективні і проти грибкових збудників, таких як *C. albicans*, *Fusarium* sp. та *A. fumigatus*. Така обробка може перемогти інфекційний кератомікоз [26].

Але в дослідженнях з біоплівками обробка рибофлавіном та УФ продемонструвала лише мінімальний вплив на *Staphylococcus aureus* ATCC 35556, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Candida albicans* ATCC 90028 та *Candida parapsilosis* ATCC 96142 порівняно із зеленим світлодіодом та барвником бенгальським червоним. Під час дослідження Tuncann G. та співавторів, формування біоплівки та антибіоплівкову активність оцінювали за допомогою різних фотосенсибілізаторів та типів опромінення. Було помічено, що найнижче пригнічення біоплівки (показники інгібування біоплівки) було виміряно у групі, яка отримувала

лікування рибофлавіном + УФ порівняно зі світлодіодами та бенгальським червоним та червоними світлодіодами з метиленовим синім. Групи, до яких застосовували рибофлавін + УФ, не виявляли впливу на формування біоплівки при *C. parapsilosis* і лише мінімально зменшували утворення біоплівки у *S. aureus* та *S. epidermidis* та на 24,5 % у *C. albicans* [27].

#### **Дія рибофлавіну як фотосенсибілізатору при інактивуванні вірусів**

Кілька досліджень виявили ефективність зменшення зараженості біоматеріалу деякими вірусами, включаючи вірус імунодефіциту людини 1 (ВІЛ-1), вірус вірусної діареї великої рогатої худоби (BVDV), вірус гепатиту В (HCV), вірус псевдосказу [28, 29] при дії рибофлавіну інактивованого УФО. Відомо, що активованій УФО або видимим світлом рибофлавін, також застосовується як засіб, що зв'язує нуклеїнові кислоти, а тобто використовується для фотоінактивування таких патогенів, як віруси, що містять нуклеїнові кислоти та знаходяться в плазмі, тромбоцитах та еритроцитах.

Було показано, що рибофлавін після опромінення ультрафіолетовим світлом істотно впливає на зменшення інфекційності вірусу Денге, випадки зараження яким виникають у всьому світі, що становлять ризик для безпеки переливання крові. Після обробки (спостерігалось зменшення 1,81 log) для DENV-4, після чого спостерігалось зменшення на 1,71 log для DENV-3 та (зменшення 1,45 log) для DENV-2, а потім зменшення на 1,81 log DENV -1. Це дослідження дійшло висновку, що рибофлавін та УФ-світло можуть бути альтернативним підходом для управління ризиком передачі DENV через трансфузію завдяки здатності інактивувати DENV 1-4 у концентратах тромбоцитів [30].

Немаловажливо, що дослідження Keil S.D. та інших показали, що рибофлавін та ультрафіолетове світло ефективно знижують титр коронавірусу респіраторного синдрому Близького Сходу (MERS-CoV) у продуктах плазми людини до межі виявлення, припускаючи що процес лікування може зменшити ризик трансфузійної передачі MERS-CoV [31].

У дослідженні Хесслінга з співавторами згадується здатність впливу світла на віруси і дійсно значне зниження розповсюдження коронавірусу. Однак, велика частка експериментів на теперішній час проводилася з вірусами в клітинах.

Живильні середовища, які можуть містити фотосенсибілізатори, такі як рибофлавін, генерують активні форми кисню під час освітлення, про що говорять Grzelak et al. [32].

Попередні дослідження впливу світла на віруси при використанні рибофлавіну, справді спостерігали значне скорочення поширення коронавірусу за допомогою видимого світла.

У дослідженнях з незараження крові та плазми, що стосуються технології знищення вірусів, отримують "реконвалесцентну плазму", яка є

ефективним засобом лікування хворих доступним в ендемічних районах. У цьому дослідженні її отримували від відновлених пацієнтів після зараження Ебола вірусом (EBOV). Реконвалесцентна плазма несе ризик інтродукції інших патогенів, в тому числі для інших штамів EBOV він знижує рівень життєздатних патогенів, при цьому не змінює рівень захисних антитіл цільної крові людини ( $\geq 3,0\text{-log}$  зменшення) та без зменшення титрів захисних антитіл у плазмі людини. Таким чином, показано тестування *in vivo*, для визначення можливості покращення безпеки продуктів реконвалесцентної крові під впливом UV + RB [33, 34].

#### **Рибофлавін як частина технології фотосенсибілізації для зниження навантаження патогенами**

Узагальнивши можливості системи «рибофлавін + UVB», науковці знайшли її застосування в технології зменшення навантаження патогенами - відома система «Mirasol»® Технологія зменшення збудника (PRT) («Terumo BCT Inc.»), Лейквуд, США), яка використовується для стерилізації крові та плазми для переливання [35].

Отримано велику кількість доказів антимікробної активності дії рибофлавіну в комбінації з УФВ, але все ще існувало питання його безпеки застосування та деяких можливих змін, які можуть відбуватися в тромбоцитах та плазмі.

Дослідження Abonnes M. та інших виявило, що оброблені Mirasol® тромбоцити мають збільшення маркерів активації та швидкості гліколізу, нижчий гіпотонічний шок та реакції активації подвійних агоністів та зниження загальної антиоксидантної здатності, що говорить про здатність до більшого терміну зберігання у порівнянні з контролем. Рибофлавін виконує внутрішньоклітинну захисну роль, тоді як позаклітинний антиоксидантний захист патогенів він зменшує. УФ-випромінювання викликає ураження тромбоцитів. У цьому дослідженні авторами були виявлені деякі переваги розчинів добавок, що містять калій і магній при зберіганні тромбоцитів. Що було підтверджено зменшенням ступеня руйнування еритроцитів протягом зберігання [36].

У дослідженнях Hermida-Nogueira та співавторів було виявлено що на 7-й день зберігання після обробки «Mirasolom»® спостерігалася дерегуляція експресії більш ніж 151 білка. Ця група білків включає C-C мотив хемокінового ліганду 5 (CCL5) та тромбоцитарний фактор 4, хемокіни зі здатністю залучати нейтрофіли та моноцити, що може спричинити побічні реакції при переливанні. Це білки, пов'язані з активацією тромбоцитів та ураженням тромбоцитів, які можуть відігравати роль у можливих побічних реакціях трансфузії. Помічено також, що інші глікопротеїни та маркери активації тромбоцитів були підвищеними на 7-й день, а білки, пов'язані з гліколізом та виробленням лактату, виявилися значно зміненими. Ці процеси на 7-й день, призводить до дерегуляції метаболізму тромбоцитів. Тобто, це може

свідчити про можливі впливи EV тромбоцитів на побічні реакції при переливанні.

#### **Рибофлавін як засіб фотодинамічної терапії раку**

Впродовж років рибофлавін досліджували як перспективний протипухлинний засіб у фотодинамічній терапії, але проблеми з незрозумілим молекулярним механізмом обмежили подальше застосування методу. У присутності рибофлавіну фотоопромінення може спричинити загибель пухлинних клітин, дефектних у системі відновлення невідповідностей, вибірково виділяючи невідповідність G-T як потенційну мішень в ракових клітинах. Це можливо, як виявилось в одному з досліджень, завдяки здатності рибофлавіну розпізнавати невідповідність G-T і ефективно опромінювати одноланцюгові розриви в дуплексних ДНК-мішенях. Більше того, рибофлавін широко вважають перспективною сполукою для подальшого проектування лікарських засобів завдяки цим його специфічним властивостям [37].

Шляхом багаторічних досліджень показали, що фотодинамічно-опосередкована цитотоксичність виникає трьома шляхами: апоптотична, некротична та пов'язана з аутофагією загибель клітин. Розрізненні данні показали, що методи фотодинамічної терапії, які діють шляхом індукування апоптотичної загибелі клітин, приводять до виділення високоімуногенних продуктів та відповідно можуть стимулювати протипухлинний імунітет [38].

Акасов Р. З з співавторами опромінювали клітини меланоми синім світлом з дозою 5 Дж/см<sup>2</sup> при попередній інкубації з флавіновим мононуклеотидом (ФМН), що призвело до загибелі ракових клітин через апоптоз. Тобто, водорозчинна форма рибофлавіну ФМН була показана як перспективний засіб для фотодинамічної терапії меланоми. Значення IC<sub>50</sub> клітин меланоми A375 людини, Mel IL та Mel Z були в діапазоні концентрацій ФМН 10 - 30 мкМ, що може бути досягнуто в тканині пухлини при системному введенні. В результаті внутрішньовенного введення ФМН з подальшим опроміненням синім світлом ділянки пухлини спостерігалася регресія ксенотрансплантата меланоми у мишей. Інгібування росту пухлини становило 85-90 % протягом 50 днів після лікування ФДТ [39].

#### **Застосування рибофлавіну як фотодинамічної терапії при лікуванні інфекційного кератиту**

Інфекційний кератит - захворювання рогівки ока, яке потенційно здатне призводити навіть до сліпоти. Тому дослідниками прийнято рішення окрім антимікробних препаратів, використовувати зшивальний колаген рогівки (CXL) шляхом фотодинамічної терапії (ФДТ). Тобто, CXL також був описаний як рибофлавін-UVA-фотодинамічна інактивація (рибофлавін-UVA-PDI) і потенційна альтернатива при лікуванні інфекційного кератиту [40, 41, 42].

Дослідження Song X. та його співавторів виявило вплив зшивання (CXL) на життєздатність, апоптоз, проліферацію, активацію та секрецію цитокінів (FGFb, HGF, TGFb1, VEGF, KGF, IL-1b, IL-6 та IL-8) кератоцитів кератоконуса (КС) людини *in vitro*. Кератоцити піддавались UVA-освітленню (370 нм, 2 Дж / см<sup>2</sup>) під час впливу 0,1 % рибофлавіну та 20 % декстрану. В результаті через 24 години після поперечного зв'язування CXL знижувалася життєздатність, запускався апоптоз та інгібувалася проліферація, без впливу на мультипотентну трансформацію гемопоетичних стовбурових клітин та міофібробластичну трансформацію кератоцитів КС. З'ясовано, що CXL запускає секрецію FGFb кератоцитів КС тимчасово (5 годин), нормалізація спостерігається через 24 години [43].

В основному фотохімічну терапію рибофлавіном / UVA застосовували додатково з іншими засобами. Скаат А. та співавтори представили дані позитивного впливу на рефрактерний інфекційний кератит такого лікування. Дослідниками був проведений ретроспективний аналіз інтервенційної серії випадків, коли 6 очей 6 пацієнтів з важким інфекційним кератитом, які всі збагачували звичайну терапію багатьма препаратами, отримували лікування рибофлавіном / UVA. В результаті п'ять із 6 пацієнтів продемонстрували зменшення розміру інфільтрату та швидке зменшення симптомів після фотохімічної терапії рибофлавіном / UVA. У пацієнтів спостерігалися зникнення ознак інфекції та запалення здебільшого протягом 1-2 тижнів після лікування. Однак, у одного пацієнта, незважаючи на таку терапію, стан продовжував погіршуватися, що змусило провести кератопластику. Але, не дивлячись на це, зазначено, що лікування ФДТ є безпечним та ефективним, і його слід розглядати як частину терапії першої лінії у важких випадках інфекційного кератиту [44].

#### **Використання фотоінактивованих патогенів як основу імунологічних аспектів створення вакцин**

За рівнем захисних імуноглобулінів до інфекційного агенту зазвичай прийнято оцінювати вакцинальний імунітет тобто за гуморальною специфічною відповіддю. Але формування специфічної імунної відповіді адаптивного імунітету, цілком обумовлено і залежить від адекватної реакції природного імунітету. Природний імунітет першим реагує і здатен створювати пришвидшену неспецифічну відповідь на мікробний агент. Це давній захист організму від інфекційних агентів. Клітинами-ефекторами природженого імунітету відбувається розпізнавання патогенів за допомогою образ-розпізнавальних рецепторів (pattern-recognition receptors – PRRs), які взаємодіють з консервативними структурами мікроорганізмів (ЛПС, ssРНК та dsРНК, пептидогліканами, ліпотейхоєвою кислотою та ін.), так званими патоген-асоційованими молекулярними структурами (PAMPs) [45, 46].

Ефекторними клітинами природженого імунітету експресуються Toll-подібні рецептори

(TLRs), які є найбільш важливими серед PRRs. TLRs після зв'язування з лігандами взаємодіють з клітинними адаптерними молекулами і починають передачу сигналу Т-лімфоцитам. Ключовими елементами ефекторних механізмів виступають дендритні клітини (DC) і натуральні кілери (NK). Саме в них відбуваються найважливіші події механізму дії бактеріальних лігандів, маркером відповіді на антиген є посилення проліферації і функціональної активності клітин-ефекторів. Розпізнавання, процесінг патогенів та антигенне представлення їх у складі молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) Т-лімфоцитам забезпечують DC. Для здійснення цих функцій DC продукують цитокіни, молекули антиген представлення, костимуляторні адгезивні молекули. Під час виконання своїх функцій DC забезпечують взаємозв'язок природженого і придбаного імунітету і програмують диференціювання Т-лімфоцитів за Th1- або Th2-типом [47, 48].

Всі вищевикладені дослідження дозволять зрозуміти передбачуваність і перспективність заміни ковалентних інактиваторів засобами фотодинамічної інактивації бактерій у вакцинології з метою подальшого впровадження в розробку нових класів нетоксичних і неалергенних вакцин.

#### **Inventive methods of vaccine development: Research of optimal conditions of photodynamic inactivation** **Khrystyna Melentieva, Artur Martynov, Svitlana Kalinichenko, Tatyana Antusheva, Petro Ovetchyn**

This topic concerns the development of hypoallergenic and non-reactogenic vaccines of the latest class, which will contribute to the creation of population immunity against many infectious diseases in all WHO identified 3 priority directions for replacing parenteral vaccines with non-parenteral ones, which are based on the ability of antigens to penetrate through mucous membranes. The most promising of them are mucosal vaccines, the use of which allows you to ensure the continuity of the antigenic stimulus and maintain a high level of collective immunity against infections managed by means of specific prevention, including COVID-19. Recently, the situation in our country regarding managed infectious diseases, both bacterial and viral, has significantly worsened and is becoming even more urgent, since large-scale hostilities in our country are accompanied by the deterioration of sanitary conditions, significant migration processes among the population of Ukraine, the accumulation of refugees in premises, the destruction of water mains, a large number of wounded servicemen and civilians who need urgent medical assistance in the field. All over the world, to reduce infectious diseases, a system of measures is widely used to prevent, limit the spread and eliminate infectious diseases. One of these means is vaccine prophylaxis. Certain problems arise in the development of vaccine preparations. For example, the spontaneous emergence of pathogenic properties, the ability to reverse attenuated strains of microorganisms, which can cause disease. Inactivated vaccines do not require strict storage and transportation conditions, so they are more attractive

for the pharmaceutical industry. That is why the search for compounds and methods for inactivating pathogens that would not form covalent bonds with the antigen, thereby increasing their reactogenicity and allergenicity, is extremely necessary. At this time, it has been established that pathogen inactivation systems (SP) in blood products are effective against numerous bacteria, viruses, and parasites and are widely used in blood product decontamination technologies in transfusion medicine. These premises gave us the idea of extrapolating the experience of transfusionists in photodynamic inactivation of blood products to vaccinology with the aim of replacing inactivators/preservatives with non-toxic metabolic photoinactivation agents that do not require vaccine purification and do not form covalent bonds with vaccine antigens. The task of researchers at this time is to eliminate shortcomings in the production of vaccine preparations by preventing the formation of covalent bonds between the modifier and the antigen - the target - toxin or pathogen. At the same time, inactivation should remain very effective. It is known that riboflavin is an activator of cellular metabolism in humans and animals, but in addition to its key role, it acts as a photosensitizer and is used in disinfection systems, which provides an antimicrobial effect. The disinfection method that uses a photosensitizer is called antimicrobial photodynamic therapy. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) is a promising approach for of pathogens in blood and blood derivatives. The advantage of antimicrobial photodynamic therapy is that there are no resistant strains to it. And the main task today is to choose the most optimal methods and conditions for finding the best methods and substances for them during photodynamic inactivation. These studies will allow us to understand the predictability and perspective of replacing covalent inactivators with means of photodynamic inactivation of bacteria in vaccinology with the aim of further implementation in the development of new classes of non-toxic and non-allergenic vaccines.

**Key words:** antimicrobial photodynamic therapy, photoinactivation, riboflavin, vaccines

## References

1. Medunitsyn N.V., Pokrovsky V.I. Fundamentals of immunoprophylaxis and immunotherapy of infectious diseases. Study allowance M. GEOTAR. Media, 2005. 512 p.
2. Novikov V.V., Dobrotyna N.A., Babaev A.A. Immunology: Textbook. allowance Nizhniy Novgorod. Publishing House of NNSU named after N.Y. Lobachevsky, 2004. 212 p.
3. Sousa V., Gomes A.T.P.C., Freitas A., et al. Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* in Blood Plasma and Whole Blood. *Antibiotics (Basel)*. 2019.8(4). 221. doi:10.3390/antibiotics8040221. ]
4. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016. 473(4). 347–364. doi:10.1042/BJ20150942.
5. 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. 18-19
6. Conrad K. S., Bilwes A. M., Crane B. R. Light-Induced Subunit Dissociation by a Light-Oxygen-Voltage Domain Photoreceptor from *Rhodobacter*. *Biochemistry*. 2013. 52(2). 378-391.
7. Kleinpenning, M.M.; Smits, T.; Frunt, M.H.A.; van Erp, P.E.J.; van de Kerkhof, P.C.M.; Gerritsen, R.M.J.P. Clinical and histologic effects of blue light on normal skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. **2010**, 26, 16–21.
8. McDonald, R.S.; Gupta, S.; Maclean, M.; Ramakrishnan, P.; Anderson, J.G.; Macgregor, S.J.; Meek, R.M.D.; Grant, M.H. 405 nm
9. Light exposure of osteoblasts and inactivation of bacterial isolates from arthroplasty patients: Potential for new disinfection applications? *Eur. Cell. Mater*. **2013**, 25, 204–214.
10. Wang, T.; Dong, J.; Yin, H.; Zhang, G. Blue light therapy to treat candida vaginitis with comparisons of three wavelengths: An in vitro study. *Lasers Med. Sci*. **2020**, 35, 1329–1339.
11. Liebmann, J.; Born, M.; Kolb-Bachofen, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J. Invest. Dermatol*. **2010**, 130, 259–269.
12. Bumah, V.V.; Masson-Meyers, D.S.; Awosika, O.; Zacharias, S.; Enwemeka, C.S. The viability of human cells irradiated with 470-nm light at various radiant energies in vitro. *Lasers Med. Sci*. **2021**, 36, 1661–1670.
13. Makdoui, K.; Hedin, M.; Bäckman, A. Different photodynamic effects of blue light with and without riboflavin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and human keratinocytes in vitro. *Lasers Med. Sci*. **2019**, 34, 1799–1805.
14. Ramakrishnan, P.; Maclean, M.; MacGregor, S.J.; Anderson, J.G.; Grant, M.H. Differential sensitivity of osteoblasts and bacterial pathogens to 405-nm light highlighting potential for decontamination applications in orthopedic surgery. *J. Biomed. Opt*. **2014**, 19, 105001.
15. Dai, T.; Gupta, A.; Huang, Y.-Y.; Yin, R.; Murray, C.K.; Vrahas, M.S.; Sherwood, M.E.; Tegos, G.P.; Hamblin, M.R. Blue light rescues mice from potentially fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn infection: Efficacy, safety, and mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2013**, 57, 1238–1245.
16. Zhang, Y.; Zhu, Y.; Gupta, A.; Huang, Y.; Murray, C.K.; Vrahas, M.S.; Sherwood, M.E.; Baer, D.G.; Hamblin, M.R.; Dai, T. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a mouse burn model: Implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections. *J. Infect. Dis*. **2014**, 209, 1963–1971.
17. Sheraz M.A., Kazi S.H., Ahmed S., et al. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J. Org. Chem*. 2014. 10. 1999–2012.
18. Khan S., Naseem I. Photocatalytic interaction of aminophylline-riboflavin leads to ROS-mediated DNA

- damage and cell death: a novel phototherapeutic mechanism for cancer. *IUBMB Life*. 2017.69. 611–622.
19. Ruane P. H., Edrich R., Gampp D., et al. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 2004. 44(6). 877-885. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.03355.x
  20. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *American Journal of Ophthalmology*. 2003. 135. 620–627, doi: 10.1016/s0002-9394(02)02220-1
  21. Khan S., Rayis M., Rizvi A., et al. ROS mediated antibacterial activity of photoilluminated riboflavin: a photodynamic mechanism against nosocomial infections. *Toxicology reports*. 2019. 6. 136-142.
  22. Maisch T., Eichner A., Späth A. et al. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PLoS One*. 2014. 9(12). e111792. ]
  23. Thakuri P.S., Joshi R., Basnet S., et al. Antibacterial photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Nepal Med. Coll. J*. 2011. 13(4). 281-284.
  24. O'Rourke J.F, Dowds B.C. Dye-mediated photodynamic inactivation of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Soc. Trans*. 1992. 20(1). 76S.
  25. Makdoui K., Goodrich R., Bäckman A. Photochemical eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by blue light activation of riboflavin. *Acta Ophthalmol*. 2017. 95(5). 498-502.
  26. Sauer A., Letscher-Bru V., Speeg-Schatz C. In vitro efficacy of antifungal treatment using riboflavin/UV-A (365 nm) combination and amphotericin B. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010. 51.8.т3950-3953.
  27. Tunccan Ö.G., Kalkanci A., Unal E.A. The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk. J. Med. Sci*. 2018. 48(4). 873–879.
  28. Schuyler R. Use of riboflavin for photoinactivation of pathogens in blood components. *Transfus. Apher. Sci*. 2001. 25. 189–190.
  29. Zhu L., Tong H., Wang S. Effectiveness of a flow-based device using riboflavin photochemistry in damaging blood-borne viral nucleic acids. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. 183. 391-396.
  30. Faddy H.M., Fryk J.J., Watterson D. Riboflavin and ultraviolet light: impact on dengue virus infectivity. *Vox Sang*. 2016. 111(3). 235-241.
  31. Keil S.D., Bowen R., Marschner S. Inactivation of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in plasma products using a riboflavin-based and ultraviolet light-based photochemical treatment. *Transfusion*. 2016. 56(12). 2948-2952.
  32. Grzelak, A.; Rychlik, B.; Bartosz, G. Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Radic. Biol. Med*. **2001**, 30, 1418–1425.
  33. Cap A.P., Pidcoke H.F., Keil S.D. et al. Treatment of blood with a pathogen reduction technology using ultraviolet light and riboflavin inactivates Ebola virus in vitro. *Transfusion*. 2016. 56(1). 6-15.
  34. Hermida-Nogueira L., Barrachina M.N., Izquierdo I., et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol® identifies biomarkers of platelet storage lesion. *J. Proteomics*. 2020. 210. 103529.
  35. Perez-Pujol S., Tonda R., Lozano M., et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 45. 6. 911-919
  36. Abonnenc M., Crettaz D., Sonogo G. et al. Towards the understanding of the UV light, riboflavin and additive solution contributions to the in vitro lesions observed in Mirasol®-treated platelets. *Transfus. Clin. Biol*. 2019. 26 (4). 209-216.
  37. Yuan Y., Zhao Y., Chen L., et al. Selective tumor cell death induced by irradiated riboflavin through recognizing DNA G-T mismatch. *Nucleic Acids Res*. 2017. 45. N. 15. P. 8676–8683.
  38. Garg A.D., Nowis D., Golab J., et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. 1805. 53–71
  39. Akasov R.A., Sholina N.V., Khochenkov D.A., et al. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Sci Rep*. 2019. 9 (1). 9679.
  40. Lim L., Lim E.W.L. A Review of Corneal Collagen Cross-linking - Current Trends in Practice Applications. *Open Ophthalmol J*. 2018. 12. 181–213.
  41. Mohammadpour M., Masoumi A., Mirghorbani M., et al. Updates on corneal collagen cross-linking: Indications, techniques and clinical outcomes. *J. Curr. Ophthalmol*. 2017. 29(4). 235–247.
  42. Zhu Y., Reinach P.S., Zhu H. et al. High-intensity corneal collagen crosslinking with riboflavin and UVA in rat cornea. *PLoS One*. 2017. 12(6). e0179580.
  43. Song X., Stachon T., Wang J., et al. Viability, apoptosis, proliferation, activation, and cytokine secretion of human keratoconus keratocytes after cross-linking. *Biomed. Res. Int*. 2015. 2015. 254-237.
  44. Skaat A., Zadok D., Goldich Y., et al. Riboflavin/UVA photochemical therapy for severe infectious keratitis. *Eur. J. Ophthalmol*. 2014. 24(1). 21-28.
  45. Medzhitov R., Janevych Ch. Innate immunity. *Kazan magazine*. 2004. T.3. P. 161-167.
  46. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006. 124 (4). 783-801.
  47. Janeway Jr. C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002. 20 (1).197-216.
  48. Romagnani S. The th1/th2 paradigm. *Immunology today*. 1997. 18 (6). 263-266.