

ЗАСТОСУВАННЯ ФОТОДИНАМІЧНОГО МЕТОДУ У ВАКЦИНОЛОГІЇ

Світлана Калініченко, Артур Мартинов, Христина
Мелентьєва, Тетяна Антушева, Ольга Коваленко,
Петро Овечин

SI " I. Mechnikov Institute of Microbiology and
Immunology of National Academy of Medical Sciences of
Ukraine"

У теперішній час для інактивації вакцинних антигенів застосовуються токсичні речовини, які вступають в хімічну реакцію з антигеном та змінюють його хімічну структуру або конфігурацію, в наслідок чого, після ковалентної реакції з інактиваторами, з'являються аномальні антигенні детермінанти, що збільшують реактогенність та алергенність вакцинних препаратів [1 - 5]. Однією з сучасних тенденцій розвитку науки з проблем удосконалення вакцинних препаратів є застосування для інактивації патогенів речовин, які є безпечними та не призводять до появи аномальних антигенних детермінант. До таких речовин можливо віднести фотосенсибілізатори.

У своєму основному стані молекула фотосенсибілізатора (PS) є синглетом, оскільки вона має два електрони з протилежними спінами [6, 7]. Поглинання фотона світла ($h\nu$) з відповідною квантовою енергією (з відповідною довжиною хвилі) призводить до збудження одного електрона на більш енергійну орбіталь. Цей синглетний PS в збудженому стані нестійкий і втрачає надлишок енергії або як випромінювання світла (флуоресценція), або як тепло (внутрішнє перетворення). Збуджений синглет PS може зазнати процесу, відомого як "міжсистемний перетин", щоб утворити більш стабільний збуджений триплетний стан з паралельними спінами. Молекула PS триплетного стану може розпадатися назад до основного стану (випромінюючи фосфоресцентний фотон), але це "заборонений процес" за правилами квантового відбору, тому триплетний стан набагато стабільніший, ніж синглетний стан, який має тривалість життя мікросекунди порівняно з лише наносекундами для збудженого синглета. Це довге життя триплетного стану дозволяє йому достатньо часу передати свою енергію, зіткнувшись 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), і реакція називається фотохімічним процесом типу II. Також може відбуватися фотохімічний процес типу I, в результаті якого PS у збудженому стані піддається реакціям переносу електронів, що з часом утворює активні форми кисню (АФК). Цей механізм може включати або отримання, або донорство електрона з утворенням радикального катіона або радикального аніона. Радикальний аніон може реагувати з киснем, утворюючи супероксидний радикальний аніон ($O_2 \cdot^-$). Дисмутація або одноелектронне відновлення $O_2 \cdot^-$ дає пероксид 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, і вважається, що більшість PS, які використовуються, наприклад, у протираковій фотодинамічній терапії, працюють за допомогою типу II, а не механізму типу I [6, 7].

Флавіни є речовинами, здатними до фотомодифікації, тобто здатні переносити заряд при поглинанні фотонів, що опосередковує клітинні сигнали або експресію генів в ендogenous білкових комплексах, таких як домени, що сприймають систему світло-кисень-напруга у бактерій і рослин. На відміну від інших речовин для інактивації вакцин, флавоноїди, що використовують у медичній та фармацевтичній промисловості, за класом токсичності Food and Drugs Administration (FDA) віднесено до "GRAS" (звичай вважається безпечними). Саме тому їх розглядають як перспективні фотоінактиватори, що мають великий антимікробний фотодинамічний потенціал. Використання фотоінактивованих патогенів надає основу для створення новітніх вакцинних препаратів [8, 9].

Таким чином дослідження щодо можливості інактивації патогенів фотодинамічним методом із застосуванням флавінів дозволить зрозуміти перспективність заміни ковалентних інактиваторів у вакцинології з метою отримання нових класів імунобіологічних препаратів.

Матеріали та методи. Об'єкт дослідження – бактеріофаг полівалентний Піофаг® (реєстраційне посвідчення №UA/15974/01/01, затверджено Наказом МОЗ України № 43 від 11.01.2022р., виробник НеоПробіоКеар Інк., Канада).

Як тест-об'єкти було використано референс-штами бактерій (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (F-49), *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F-51), одержані з Філії Національного музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» і клінічні штами *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*, які вилучено з виділень нижніх дихальних шляхів хворих на пневмонію на території України, не пізніше ніж за 3 роки до проведення даного дослідження.

Як джерело ультрафіолетового світла було використано опромінювачі бактерицидні побутові з озоною бактерицидною лампою ОБВ 15P-METAL, країна виробник Польща. Технічні характеристики: потужність УФ-С опромінювання 3,1 Вт; частота 50 Гц; довжина бактерицидної хвилі 253,7 нм.

Визначення чутливості бактерій до специфічних бактеріофагів проводили крапельним методом [10, 11]. Визначення інфекційної активності фагів проводили титруванням за Аппельманом, за Грація та за допомогою spot-тесту [12, 13]. Обробка експериментальних даних здійснена відповідно до правил рядової і альтернативної варіаційної статистики [14] на персональному комп'ютері за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2000 і пакета прикладних програм для обробки медико-біологічної інформації "Biostat-4".

Результати та обговорення. Для експериментальних досліджень відбір типових за морфологічними, тинкторіальними і біохімічними ознаками клінічних ізолятів *E. coli*, *P. aeruginosa* та *S. aureus* проводили за їх фагочутливістю до специфічних бактеріофагів (рис. 1).

Фагочутливість було визначено у 122 клінічних штамів *E. coli*. Встановлено, що серед клінічних штамів

кишкової палички 4,7 % не мали чутливості до Піофаг®, 47,6 % мали чутливість на рівні окремих негативних колоній (від 10 і більше 20) – слабка та помірна, 47,7 % мали достатню чутливість (напівзливний та зливний лізис) до зазначеного комерційного полівалентного бактеріофагу (див. рис. 1).

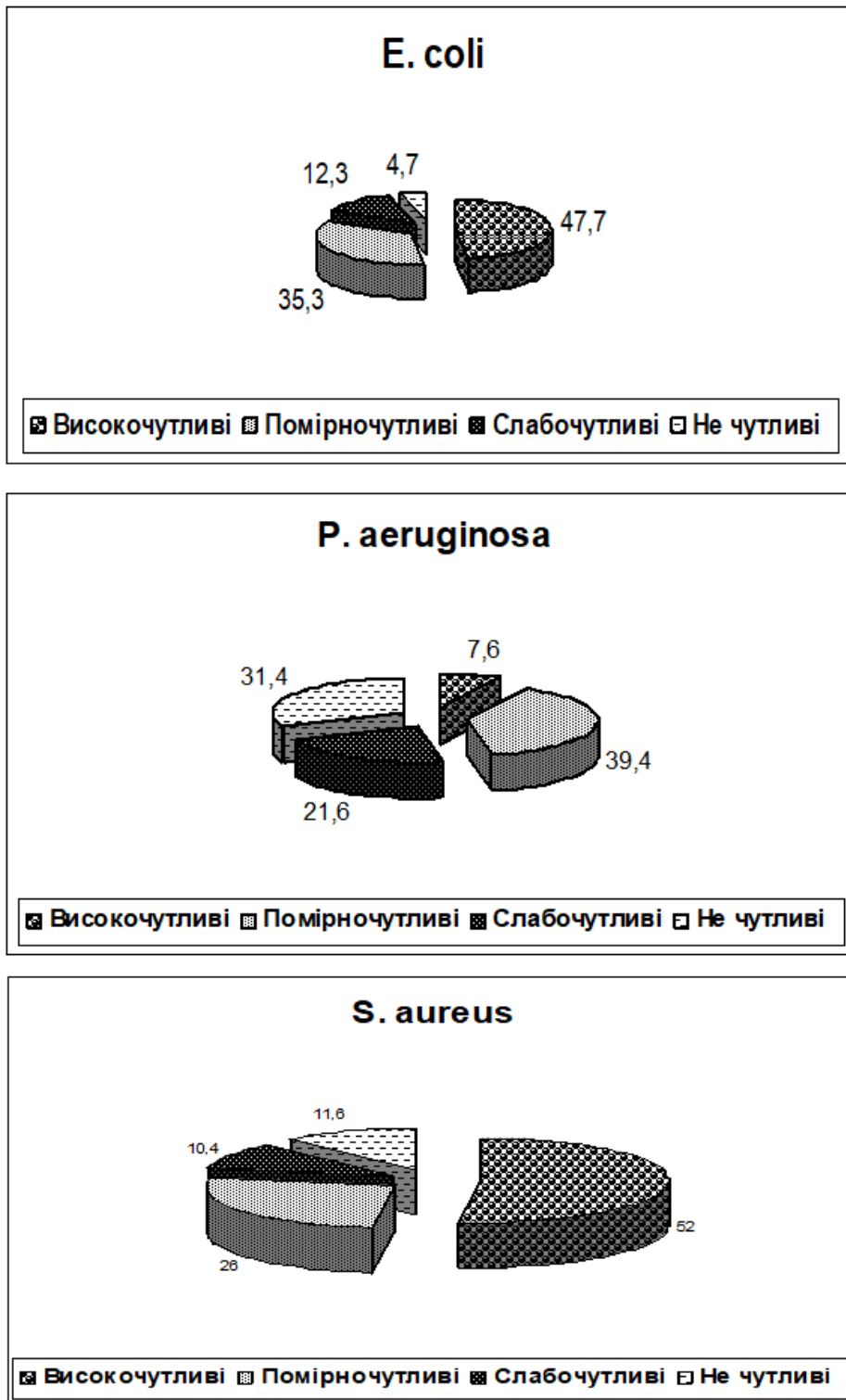


Рисунок 1. Розподіл клінічних штамів за фагочутливістю, %.

Серед 33 клінічних штамів синьогнійної палички відсоток штамів, що не мав чутливості до комерційного полівалентного бактеріофагу становив 31,4 %, 61 % клінічних штамів мали чутливість на рівні окремих негативних колоній, і тільки 7,6 % клінічних штамів *P. aeruginosa* мали високу чутливість (напівзливний та зливний лізис) до Піофаг® (див.рис. 1 Б).

Найчастіше при пневмоніях вилучались клінічні штами *S. aureus*. Було виділено та досліджено 354 штами золотистого стафілокока. Серед них 11,6 % штамів не мали чутливості до Піофаг®, відсоток штамів, що мали чутливість на рівні окремих негативних колоній становив 36,4 %, а тих, що мали високу чутливість до зазначеного комерційного полівалентного бактеріофагу (напівзливний та зливний лізис) становив 52 % (див.рис. 1 В).

Отримані дані можуть бути використані як при призначенні етіотропної терапії хворим на пневмонію, так і для наукових розробок. У подальші дослідження було взято штами *E. coli*, *P. aeruginosa* та *S. aureus* що мали ступінь лізису CL або SCL.

Титрування (визначення інфекційної активності) комерційного бактеріофагу Піофаг® проводилось двома методами: спочатку за Аппельманом (визначення найбільшого розведення фага, яке пригнічує ріст тест-культур), а потім за Грація (визначення БУО в 1 мл).

Експериментально встановлено, що інфекційна активність (титр фага) комерційного бактеріофагу Піофаг® за методом Аппельмана становить 10^{-9} (таблиці 1-3).

Таблиця 1. Інфекційна активність Піофаг® до штамів *P. aeruginosa* за методом Аппельмана

Тест-штам	Розведення Піофаг®									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>P. aeruginosa</i> 1221	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>P. aeruginosa</i> 2267	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-

Примітка: «+» – наявність повного лізису; «±» – наявність часткового лізису; «-» – відсутність лізису

Таблиця 2. Інфекційна активність Піофаг® до штамів *S. aureus* за методом Аппельмана

Тест-штам	Розведення Піофаг®									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>S. aureus</i> 101	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>S. aureus</i> 191	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-

Примітка: «+» – наявність повного лізису; «±» – наявність часткового лізису; «-» – відсутність лізису

Таблиця 3. Інфекційна активність Піофаг® до штамів *E. coli* за методом Аппельмана

Тест-штам	Розведення Піофаг®									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (F-50)	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>E. coli</i> 516	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>E. coli</i> 1018	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-

Примітка: «+» – наявність повного лізису; «±» – наявність часткового лізису; «-» – відсутність лізису

Визначення БУО в 1 мл комерційних фагів за методом Грація проводили із розведення 10^{-8} , яке давало повний лізис тест-культури при визначенні титру за методом Аппельмана (таблиці 4-6).

Таблиця 4. Інфекційна активність Піофаг® до штамів *P. aeruginosa* за методом Грація

Тест-штам	БУО	Активність бактеріофага відносно тест-культури, $M \pm \sigma$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	3,66±0,57
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	3	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	5	
<i>P. aeruginosa</i> 1221	6	5,66±0,57
<i>P. aeruginosa</i> 1221	5	
<i>P. aeruginosa</i> 1221	6	
<i>P. aeruginosa</i> 2267	2	1,66±0,57
<i>P. aeruginosa</i> 2267	2	
<i>P. aeruginosa</i> 2267	1	

Таблиця 5. Інфекційна активність Піофаг® до штамів *S. aureus* за методом Грація

Тест-штам	БУО	Активність бактеріофага відносно тест-культури, $M \pm \sigma$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4	4,33±0,57
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5	
<i>S. aureus</i> 101	7	6,33±1,15
<i>S. aureus</i> 101	7	
<i>S. aureus</i> 101	5	
<i>S. aureus</i> 191	1	2,33±1,15
<i>S. aureus</i> 191	3	
<i>S. aureus</i> 191	3	

Таблиця 6. Інфекційна активність Піофаг® до штамів *E. coli* за методом Грація

Тест-штам	БУО	Активність бактеріофага відносно тест-культури, $M \pm \sigma$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	4,33±0,57
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	5	
<i>E. coli</i> 516	7	6,33±1,15
<i>E. coli</i> 516	7	
<i>E. coli</i> 516	5	
<i>E. coli</i> 1018	6	6,33±0,57
<i>E. coli</i> 1018	6	
<i>E. coli</i> 1018	7	

Відповідно до таблиць 4-6 у клінічних штамів, до яких Піофаг® проявляв більш високу літичну активність (CL – зливний лізис) у попередньому досліді, також були вищими і показники БУО, що, з нашої точки зору, обумовлено різною чутливістю штамів до культури бактеріофагів.

Експериментально визначено, що середня активність комерційного бактеріофага Піофаг® до взятих в дослід тест-культур *P. aeruginosa* становила $(3,66 \pm 0,62) \times 10^9$ БУО/мл, до тест-культур *E. coli* $(5,66 \pm 0,41) \times 10^9$ БУО/мл та $(4,33 \pm 0,64) \times 10^9$ БУО/мл. до тест-культур *S. aureus*.

Для визначення методології інактивації та контролю інактивації вірусу фотодинамічним методом на моделі Піофаг® прямим та реверсійним методами. З основного розчину фотоінактиватора (1 % рибофлавін) робили наступні розведення у ізотонічному розчині з Піофаг®: 0,5 %; 0,2 %; 0,1 %; 0,05 %; 0,02 % та 0,01 %. Режими опромінення були наступними: 60 хв; 45 хв; 30 хв; 15 хв. При постійному перемішуванні в шейкері. Після чого робили висіви (по 10 мкл) із зразків на відповідні тест-культури за методом spot-тесту, інкубували протягом 18 - 20 год при 28 - 29 °C та проводили облік результатів. Експериментально визначено, що опромінення УФ протягом 60 хв призводило до віруліцидної дії у всіх дослідах, незалежно від застосування ФС. Розчини

рибофлавіну у концентраціях від 0,5 % до 0,05 % частково захищали бактеріофаг від дії УФО – після 45-хвилинного опромінення фіксувались окремі негативні колонії на відміну від контролю. Інактивація бактеріофагів на рівні контролю була визначена за впливу двох концентрацій фотоінактиватора – 0,02 % і 0,01 %.

Відомо, що під впливом УФО може відбуватись мутаційні процеси, які індукує це опромінення. Мутації, індуковані УФО, можуть мати переривчастий стрибкоподібний характер і призводить до змін спадкоємних властивостей вірусів. Але мутації вірусів можуть бути не тільки прямими, а й зворотними з можливою їхньою реверсією до дикого типу, що пов'язано не тільки з гетерогенністю вірусної популяції, але і з наявністю в генетично однорідній популяції часток вірусу, що володіють низькою стабільністю спадкоємних властивостей. За даними літератури мутантні віруси, отримані при застосуванні ультрафіолетових променів, давали близько 20 % реверсій [15].

Для перевірки чи не відбувається спонтанна реверсія взятих у дослід штамів бактеріофагів Піофаг® із дослідних зразків робили висіви з періодичністю 1 раз в 2 тижні протягом 3 місяців. В таблицях 7-9 наведено результати через 3 місяці спостережень.

Таблиця 7. Визначення реверсійної активності Піофаг щодо штамів *P. aeruginosa*

Зразки	Концентрація мікробних клітин							
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
К _к	-	-	-	-	-	-	-	-
К _ф	SCL	SCL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
№ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 2	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: К_к – контроль культури; К_ф – контроль Піофаг®; CL – зливний лізис; SCL – напівзливний лізис; +++ – окремі негативні колонії (більше 20); ++ – окремі негативні колонії (від 10 до 20); +- – окремі негативні колонії (до 10); - – відсутність лізису.

Таблиця 8. Визначення реверсійної активності Піофаг щодо штамів *E. coli*

Зразки	Концентрація мікробних клітин							
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
К _к	-	-	-	-	-	-	-	-
К _ф	SCL	SCL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
№ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 2	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: К_к – контроль культури; К_ф – контроль Піофаг®; CL – зливний лізис; SCL – напівзливний лізис; +++ – окремі негативні колонії (більше 20); ++ – окремі негативні колонії (від 10 до 20); +- – окремі негативні колонії (до 10); - – відсутність лізису.

Таблиця 9. Визначення реверсійної активності Піофаг щодо штамів *S. aureus*

Зразки	Концентрація мікробних клітин							
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
К _к	-	-	-	-	-	-	-	-
К _ф	SCL	SCL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
№ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
№ 2	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: К_к – контроль культури; К_ф – контроль Піофаг®; CL – зливний лізис; SCL – напівзливний лізис; +++ – окремі негативні колонії (більше 20); ++ – окремі негативні колонії (від 10 до 20); +- – окремі негативні колонії (до 10); - – відсутність лізису.

Отримані результати вказують на те, що ультрафіолетові промені викликають, скоріш за все, локальні зміни вірусної нуклеїнової кислоти Піофаг®, що ведуть до заміни окремих основ, таким чином реверсія штамів бактеріофагів, які входять до складу Піофаг® не відбувалась.

За результатами експерименту було прийнято рішення використовувати у подальших дослідках 0,02 % і 0,01 % розчини рибофлавіну при режимі УФО 15 хвилин.

Application of the photodynamic method in vaccinology
Svitlana Kalinichenko, Artur Martynov, Khrystyna Melentieva, Tetyana Antusheva, Olha Kovalenko, Petro Ovetchyn

Intriduction. Currently, toxic substances are used to inactivate vaccine antigens, which enter into a chemical reaction with the antigen and change its chemical structure or configuration, as a result of which, after a covalent reaction with inactivators, abnormal antigenic determinants appear that increase the reactogenicity and allergenicity of vaccine preparations. One of the modern trends in the development of science related to the improvement of vaccine preparations is the use of substances that are safe and do not lead to the appearance of abnormal antigenic determinants for the inactivation of pathogens. Such substances can include photosensitizers. The use of photoinactivated pathogens provides a basis for the creation of the latest vaccine preparations. Flavins are substances capable of photomodification, i.e. able to transfer charge upon absorption of photons, which mediates cell signaling or gene

expression in endogenous protein complexes, such as light-oxygen-voltage sensing domains in bacteria and plants. Unlike other substances for inactivating vaccines, flavonoids used in the medical and pharmaceutical industry are classified as "GRAS" (generally regarded as safe) by the Food and Drugs Administration (FDA) toxicity class.

Materials and methods. The object of the study is the bacteriophage polyvalent Piophage®. Reference strains of bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (F-49), *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (F- 51). Bactericidal irradiators (bactericidal wavelength 253.7 nm) were used as a source of ultraviolet light. Riboflavin solution in polysorbate-80 0.02%-1.0% (Fluka, Austria) was used as a photoinactivator.

Results & Discussion. Phage sensitivity was determined in 122 clinical strains of *E. coli*. It was established that among the clinical strains of *Escherichia coli*, 4.7% were not sensitive to Piophage, 47.6% had sensitivity at the level of individual negative colonies (from 10 to more than 20) - weak and moderate, 47.7% had sufficient sensitivity (semi-fluid and fluid lysis) to the indicated commercial polyvalent bacteriophage. Among 33 clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, the percentage of strains that were not susceptible to commercial polyvalent bacteriophage was 31.4%, 61% of clinical strains were susceptible at the level of individual negative colonies, and only 7.6% of clinical strains of *P. aeruginosa* were highly susceptible (semi-draining and draining lysis) to Piophage. It was experimentally established that the infectious activity (phage titer) of the commercial Piophage bacteriophage according to the Appelman method

is 10^{-9} . Determined that the average activity of the commercial bacteriophage Piofag to the tested *P. aeruginosa* test cultures was $(3.66 \pm 0.62) \times 10^9$ IU/ml, to the *E. coli* test cultures $(5.66 \pm 0.41) \times 10^9$ IU/ml and $(4.33 \pm 0.64) \times 10^9$ IU/ml. to test cultures of *S. aureus*. It was experimentally determined that UV irradiation for 60 minutes led to a virulicidal effect in all experiments, regardless of the use of FS. Solutions of riboflavin in concentrations from 0.5% to 0.05% partially protected the bacteriophage from UV radiation - after 45 minutes of irradiation, individual negative colonies were recorded, in contrast to the control.

Inactivation of bacteriophages at the level of controls was determined under the influence of two concentrations of photoinactivator - 0.02% and 0.01%. **Conclusion.** The obtained results indicate that ultraviolet rays cause, most likely, local changes in the Piofag® viral nucleic acid, leading to the replacement of individual bases, thus the reversion of bacteriophage strains included in Piofag® did not occur. According to the results of the experiment, the best concentrations of riboflavin for further experiments were found to be 0.02% and 0.01% at UVF for 15 minutes.

Keywords: phytoinactivators, bacteriophage, bacteria, vaccines.

References:

1. 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.
2. Makdoui, K.; Hedin, M.; Bäckman, A. Different photodynamic effects of blue light with and without riboflavin on methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and human keratinocytes in vitro. *Lasers Med. Sci.* **2019**, *34*, 1799–1805.
3. Informational and analytical search for innovative methods of virus inactivation / Kalinichenko S.V., Martynov A.V., Toryanyk I.I., Dubinina N.V., Tishchenko I.Yu. // Innovative ways of improving medicine, psychology and biology: collective monograph / Khrebtii H. – etc. - International Science Group. - Boston: Primedia eLaunch, 2023. 305. Available at: DOI - 10.46299/ISG.2023.MONO.MED.2. p. 250-268
4. 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.
5. 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.
6. Inactivation of pathogens by the photodynamic method / Kalinichenko S., Dubinina N. // Scientific space: integration of traditional and innovative processes : Scientific monograph. Riga, Latvia : “Baltija Publishing”, 2023. 600 p. – P. 171-195. ISBN: 978-9934-26-310-1 DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-310-1>
7. 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.
8. Modern methods of vaccine development: study of optimal conditions of photodynamic inactivation / Melentieva H., Martynov A., Kalinichenko S., Antusheva T., Ovetchny P. *Annals of the Mechnikovsky Institute* 2023. No. 4, pp. 4-11. <https://journals.urau.am/article/view/288795/285517>
9. 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.
10. Laboratory tests. Microbiological and virological diagnostics / ed. M. Kh. Turyanova, M. Kappa - M.: Kappa, 1995. - 111 p.
11. 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.
12. 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.]
13. Makdoui, K.; Hedin, M.; Bäckman, A. Different photodynamic effects of blue light with and without riboflavin on methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and human keratinocytes in vitro. *Lasers Med. Sci.* **2019**, *34*, 1799–1805.
14. Terrosi, C.; Anichini, G.; Docquier, J.D.; Gori Savellini, G.; Gandolfo, C.; Pavone, F.S.; Cusi, M.G. Efficient Inactivation of SARS-CoV-2 and Other RNA or DNA Viruses with Blue LED Light. *Pathogens* 2021, *10*, 1590. [CrossRef]
15. 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.