

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ ПАРАМЕТРІВ ІНАКТИВАЦІЇ ВІРУСВМИСНОГО МАТЕРІАЛУ ФОТОДИНАМІЧНИМ МЕТОДОМ

Христина Мелентьєва¹, Артур Мартинов¹, Світлана
Калініченко¹, Валерій Мінухін¹, Ольга Коваленко²,
Тетяна Антушева¹, Петро Овечин¹, Тетяна Кордон¹

- 1- Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»
- 2- Інститут радіофізики та електроніки ім. І. Я. Усікова Національної академії наук України

Для зниження інфекційних захворювань, у всьому світі, широко застосовується система заходів, які здійснюються з метою попередження, обмеження розповсюдження та елімінації інфекційних хвороб. Одним з цих засобів є вакцинопрофілактика [1]. Вакцини є медичними імунобіологічними препаратами, що призначені для створення специфічного імунітету до інфекційного захворювання. Їх виробляють із ослаблених або інактивованих мікроорганізмів, продуктів їх життєдіяльності або з їх антигенів, у тому числі з антигенів, одержаних генно-інженерним або хімічним шляхом [2].

Для отримання вакцинних антигенів, штами, як правило, інактивують або шляхом нагрівання, або обробкою хімічними речовинами: формаліном чи пропіолактоном, ацетоном, спиртом, мертіолом тощо. Зазначені речовини можуть вступати в хімічну реакцію з білками антигенів та змінювати їхню хімічну структуру або конфігурацію, утворюючи ковалентні зв'язки між білками токсинів і хімічним чинником, в наслідок чого з'являються аномальні антигенні детермінанти, що збільшують реактогенність та алергенність вакцинних препаратів [1, 2]. Однією з сучасних тенденцій щодо проблем удосконалення вакцинних препаратів є пошук сполук та методів для інактивації патогенів, які б були безпечними та не призводили до появи аномальних антигенних детермінант.

На цей час встановлено, що системи інактивації патогенів (СП) в препаратах крові є ефективними проти численних бактерій, вірусів і паразитів та широко застосовуються в технологіях обеззаражування продуктів крові в трансфузіології [3-8].

Ці передумови дали нам ідею про екстраполяцію досвіду трансфузіологів з фотодинамічної інактивації препаратів крові на вакцинологію з метою заміни інактиваторів/консервантів та нетоксичні метаболітні засоби фотінактивації, від яких не потрібно очищувати вакцину та які не утворюють ковалентних зв'язків з антигенами вакцин.

Матеріали та методи. Як вірусвмісний матеріал було використано 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 для розвитку вірусів 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 опромінення 3,1 Вт; частота 50 Гц; довжина бактерицидної хвилі 253,7 нм.

Як фотінактиватори/фотосенсибілізатори було використано суміш (1:1:1) розчинів рибофлавіну, рибофлавіну менадіону сульфат натрію (менадіону) та піроксидину гідрохлориду у концентрації від 2×10^{-4} % до 2×10^{-6} % в полісорбаті-80, (Fluka, Австрія).

Визначення інфекційної активності фагів проводили титруванням за Апфельманом, за Грація та за допомогою spot-тесту [6 - 11]. Обробка експериментальних даних здійснена відповідно до правил рядової і альтернативної варіаційної статистики [12] 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 їх обговорення. В попередніх дослідах нами було визначено концентрації кожного з фотосенсибілізаторів та час їхнього опромінення ультрафіолетом (УФ), тому в цьому експерименті нами було проведено дослідження здатності суміші фотінактиваторів (ФІ) інактивувати вірусвмісний матеріал.

Для наближення умов фотодинамічної інактивації вірусвмісного матеріалу до виробничих, досліди було проведено у об'ємах 100 мл. Для цього використовувались стерильні одноразові ПВХ-пакети для крові (рис. 1).

Отримані результати вказують на те, що ультрафіолетове опромінення (УФО) викликає, скоріш за все, локальні зміни вірусної нуклеїнової кислоти в вірусах Піофаг®, що ведуть до заміни окремих основ, таким чином реверсія штамів бактеріофагів, які входять до складу Піофаг® не відбувається [10 - 15].

За результатами експериментів найкращі результати щодо фотінактивації вірусвмісного матеріалу було отримано для 0,02 % і 0,01 % суміші фотосенсибілізаторів. Час опромінення УФО при цих концентраціях складає від 5 до 15 хвилин. Для практичного використання рекомендовано застосовувати 0,02 % і 0,01 % розчини рибофлавіну, піроксидину і менадіону у співвідношенні 1:1:1 при режимі УФО 5-15 хвилин.

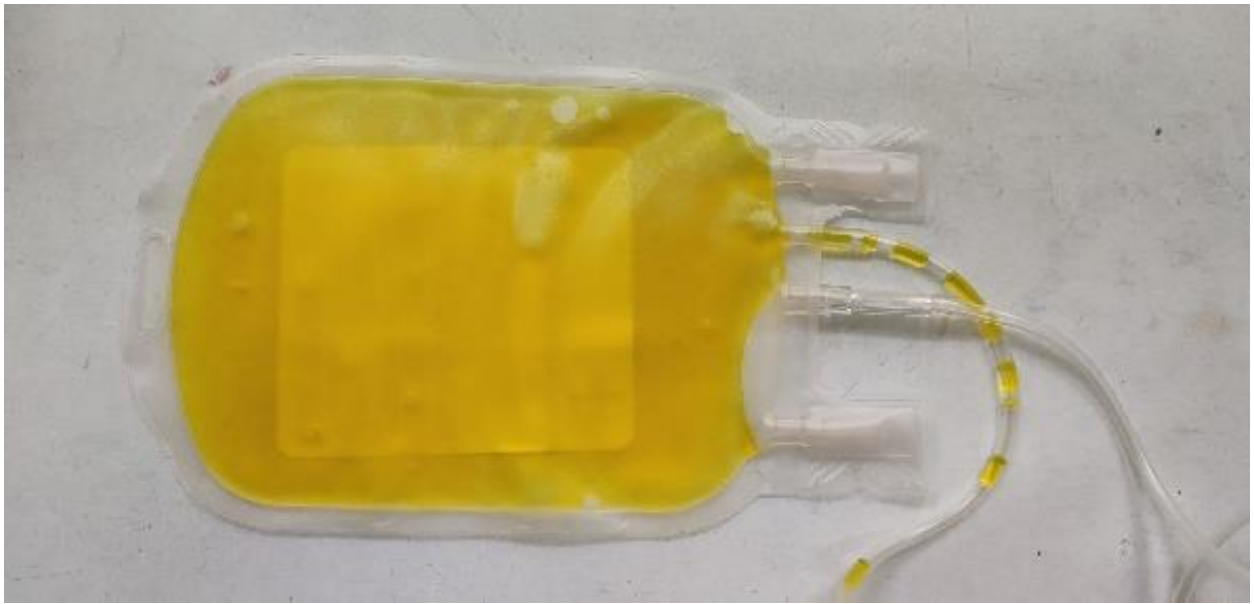


Рисунок 1 – Суміш ФС у стерильному одноразовому ПВХ-пакеті для крові

Для охоплення всієї площі пакету УФ опроміненням використовували 2 опромінювача з озonoвою бактерицидною лампою OVB 15P-METAL, потужність УФ-С опромінення 3,1 Вт; частота 50 Гц; довжина бактерицидної хвилі 253,7 нм (рис. 2).

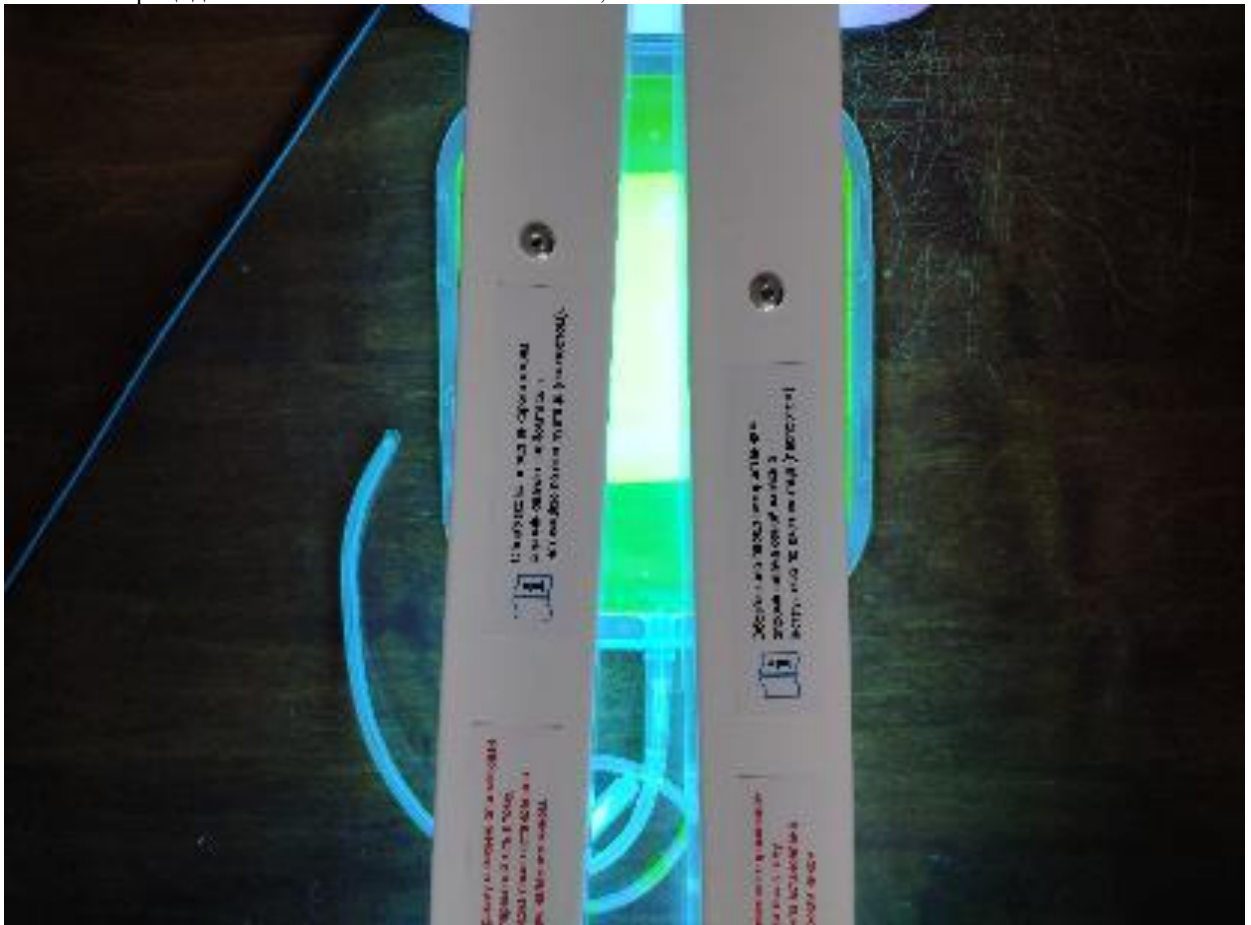


Рисунок 2 – ФД інактивація вірусемісного матеріалу в стерильному одноразовому ПВХ-пакеті для крові

За результатами визначення кількості встановлено достовірне зниження цього показника при бляшкоутворюючих одиниць (БУО/мл) Піофаг® застосуванні ФС (рис. 3).

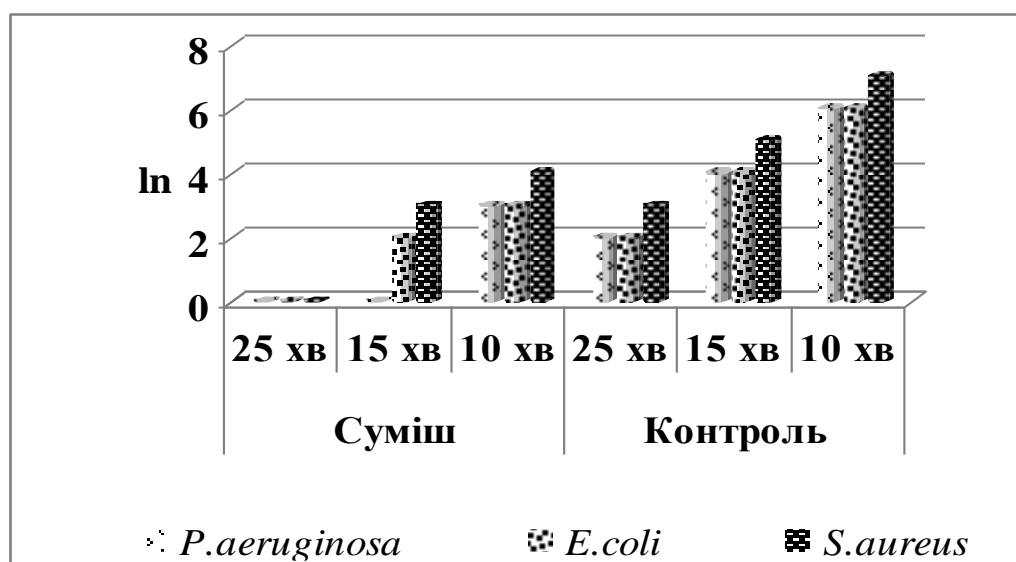


Рисунок 3 – Результати інактивації вірусвмісного матеріалу з використанням ФС та без них

Подовження часу опромінення до 45 хв призводило до 100 % віруліцидного ефекту і в контролі.

Перевірка на спонтанну реверсію цих зразків протягом трьох місяців не виявила живих вірусів (таблиці 1-3).

Таблиця 1 – Визначення реверсійної активності вірусвмісних зразків, отриманих фотодінамічною інактивацією 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 2 – Визначення реверсійної активності вірусвмісних зразків, отриманих фотодінамічною інактивацією 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 3 – Визначення реверсійної активності вірусемісних зразків, отриманих фотодінамічною інактивацією 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.

Experimental determination of optimal parameters of virus-containing material inactivation by photodynamic method

Khrystyna Melentiyeva, Artur Martynov, Svitlana Kalinichenko, Valery Minukhin, Olga Kovalenko, Tetyana Antusheva, Petro Ovetchyn, Tetyana Kordon

Introduction. To obtain vaccine antigens, strains are usually inactivated either by heating, or by treatment with chemicals: formalin or propiolactone, acetone, alcohol, merthiolate, etc. These substances can enter into a chemical reaction with antigen proteins and change their chemical structure or configuration, forming covalent bonds between toxin proteins and a chemical factor, as a result of which abnormal antigenic determinants appear, increasing the reactogenicity and allergenicity of vaccine preparations. One of the current trends in the problems of improving vaccine preparations is the search for compounds and methods for inactivating pathogens that would be safe and would not lead to the appearance of abnormal antigenic determinants. To date, it has been established that pathogen inactivation systems (SIP) in blood products are effective against numerous bacteria, viruses, and parasites and are widely used in blood product decontamination technologies in transfusion medicine. Such as flavins, which is capable of photomodification, i.e., transfers a charge upon absorption of photons, which mediates cellular signaling or gene expression in endogenous protein complexes, such as light and oxygen sensing domains in bacteria and plants. **Materials and methods.** The object of research is the polyvalent Piophage® bacteriophage. 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 an ultraviolet source. As photoinactivators/photosensitizers, a mixture (1:1:1) of solutions of riboflavin, riboflavin menadione sulfate (menadione) and pyridoxine hydrochloride in a concentration of 2×10⁻⁴% to 2×10⁻⁶% in polysorbate-80 was used (Fluka, Austria) Determination of the infectious activity of phages was carried out by titration according to Appelman, according to Graz and using the spot test. **Results and discussion.** According to the results of determining the number of plaque-forming units (PFU/ml) of Piophage®, a significant decrease of this indicator was established when using PS. Extending the irradiation time to 45 minutes led to 100% virulicidal effect in the control as well. Testing for spontaneous reversion of these samples over a three-month period revealed no live virus. The obtained results indicate that ultraviolet irradiation (UV) causes, most likely, local changes in the viral nucleic acid in Piophage® viruses,

leading to the replacement of individual bases, thus the reversion of bacteriophage strains that are part of Piophage® does not occur. **Conclusion.** According to the results of the experiments, the best results regarding the photoinactivation of the virus target material were obtained for 0.02% and 0.01% of the mixture of photosensitizers. UV radiation exposure time at these concentrations ranges from 5 to 15 minutes. For practical use, it is recommended to use 0.02% and 0.01% solutions of riboflavin, pyrooxidin, and menadione in a ratio of 1:1:1 in the UFR mode for 5-15 minutes.

Key words: phytoinactivators, bacteriophage, bacteria, vaccines.

References:

1. Modern methods of vaccine development: study of optimal conditions of photodynamic inactivation / Melentiyeva K., Martynov A., Kalinichenko S., Antusheva T., Ovetchyn P. *Annals of the Mechnikovsky Institute* 2023. No. 4, pp. 4-11. <https://journals.urau.ua/ami/article/view/288795/285517>
2. 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 p. Available at : DOI – 10.46299/ISG.2023.MONO.MED.2. c. 250-268*
3. 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.
4. 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.
5. 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>*
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. Laboratory tests. Microbiological and virological diagnostics / ed. M. Kh. Turyanova, M. Kappa - M.: Kappa, 1995. - 111 p.
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. Handbook of medical virology / ed. V. M. Girina - K.: Zdorovya, 1995. - 367 p.
12. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statistical methods in medical and biological research using Excel. 2nd ed., revised. and additional K. MORION. 2001. 408 p. ISBN 966-7632-33-4
13. Rajesh P. Rastogi, Richa, Ashok Kumar, et al. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids*. 2010; 2010: 592980. Published online 2010 Dec 16. doi: 10.4061/2010/592980
14. 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.
15. 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.