

SECTION 7. THEORICAL MEDICINE

DOI: 10.46299/ISG.2023.MONO.MED.2.7.1

7.1 Інформаційно-аналітичний пошук інноваційних методів інактивації вірусів

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.

Хоча поширення вірусних захворювань, таких як ВІЛ, вірусних гепатитів В та С, через переливання крові контролюється в значній мірі, але загроза виникнення захворювань від патогенних мікроорганізмів та бактеріальне забруднення клітинних компонентів крові – концентратів еритроцитів, тромбоцитів, гемопоетичних стовбурових клітин – залишається серйозною загрозою з серйозними клінічними наслідками. На відміну від добре сформованих стратегій інактивації патогенів для свіжозамороженої плазми за допомогою процедури застосування розчинника – миючого засобу або метиленового синього і видимого світла, щодо трансляції нової технології інактивації патогенів для клітинних компонентів крові, таких як тромбоцити та червоні клітини крові, дискусії все ще ведуться [301].

Розроблені системи інактивації патогенів (СІП) виявилися ефективними проти численних бактерій, вірусів та паразитів. Для знезараження концентратів тромбоцитів в світі використовуються дві основні системи: обробка псораленом (рис. 1 А) з ультрафіолетом А та обробка рибофлавіном (вітамін В₂) (рис. 1 Б) з ультрафіолетом Б, обидві з яких спрямовані на незворотну фрагментацію нуклеїнових кислот збудників.

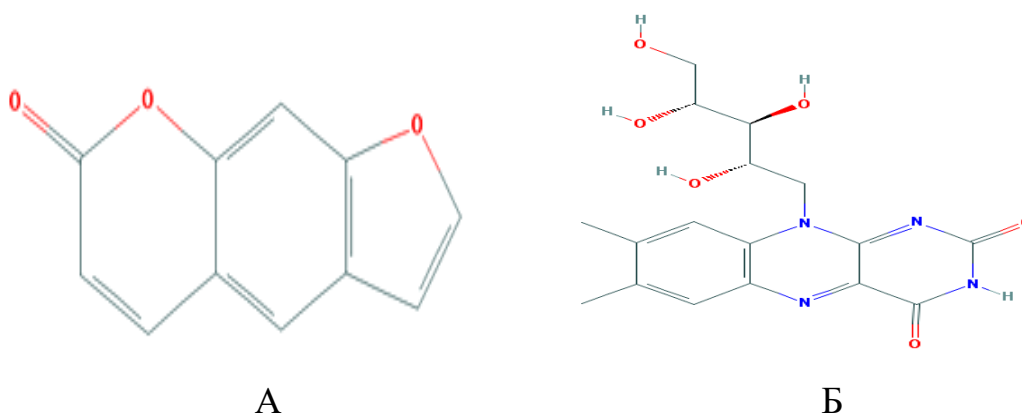


Рисунок 1. Хімічна структура псоралену (А) і рибофлавіну (Б)

Раніше було описано здатність системи Mirasol PRT знешкоджувати як патогени, так і білі кров'яні клітини. Технологія використовує комбінацію рибофлавіну та УФ-світла, щоб викликати незворотне ураження у нуклеїнових кислотах збудників та білих кров'яних клітинах (WBCs) для пригнічення реплікації і функції патогенів (вірусів, бактерій та грибів) [302].

Отже, методики СІП можуть розглядатися як "зміна парадигми" для забезпечення безпечного переливання компонентів крові, оскільки СІП використовує різні фізичні, хімічні чи фотохімічні способи для видалення або інактивації внутрішньо-клітинних патогенів, таких як віруси, бактерії та паразити в компонентах крові або їх продуктах без зміни імуногенності останніх. Ці методи СІП включають, але не обмежують розчинник/детергент (S/D), нанофільтрацію та фотохімічну інактивацію, такі як використання метиленового синього (МС) (рис. 2), псоралену або рибофлавіну.

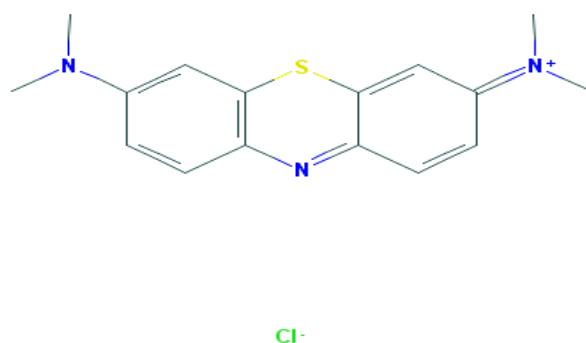


Рисунок 2. Хімічна структура метиленового синього

На даний час дослідження щодо технології СП для компонентів крові (плазми, еритроцитарної маси та тромбоцитів) досягли значного прогресу. Можна вибрати кілька способів інактивації, включаючи МС, псоралени та рибофлавін. Ці методи спрямовані на деградацію вірусних нуклеїнових кислот (НК) завдяки фотохімічним ефектам.

Після впливу видимого світла з діапазоном хвиль 620-670 нм МС може виділяти реактивні види кисню (переважно синглетний кисень) за допомогою фотодинамічної реакції, щоб індукувати гуанін-специфічне розщеплення вірусної НК, що призводить до інактивації вірусів. МС ефективний для інактивації багатьох капсульних вірусів. Хоча іноді повідомляють про деякі алергічні побічні реакції, МС застосовується для інактивації індивідуальних контейнерів з плазмою у 18 країнах світу з мінімальною токсичністю, що підтверджує тривалу безпеку плазми, оброблену МС [303].

Амотозален (S-59), відомий як ефективний фотосенсибілізатор, є синтетичним псораленом, що отримувався раніше з численних рослин. Через три етапи світлової обробки, збуджений амотозален інгібує також реплікацію, механізм транскрипції та репарацію нуклеїнових кислот. Технологію інактивації плазми на основі псоралену (Cerus, Concord, CA) впроваджено як успішно розроблений комерційний продукт Amotosalen / UVA, що використовується майже десять років у більш, ніж 20 країнах. Ефективність цієї технології було доведено для інактивації широкого спектру вірусів, бактерій та паразитів, а також лейкоцитів, що містяться в продуктах крові, і вважається безпечною без будь-яких незвичайних побічних ефектів або токсичності чи реактогенності [304].

Сполуки на основі рибофлавіну (вітамін B₂), як інактиватори патогенів, діють завдяки освітленню УФ-випромінюванням (265-370 нм). Ця фотодинамічна реакція генерує синглетний кисень, який відповідає за фотоокислення гуанінових залишків у нуклеїнових кислотах і призводить до розриву та фрагментації ланцюга полінуклеотиду, завдяки чому незворотно пошкоджує нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК) та дезамінує і декарбоксилює

амінокислоти в складі білків без суттєвої зміни їх структури при більш довготривалій експозиції в присутності світла. Механізм активації рибофлавіну наведено на рис. 3.

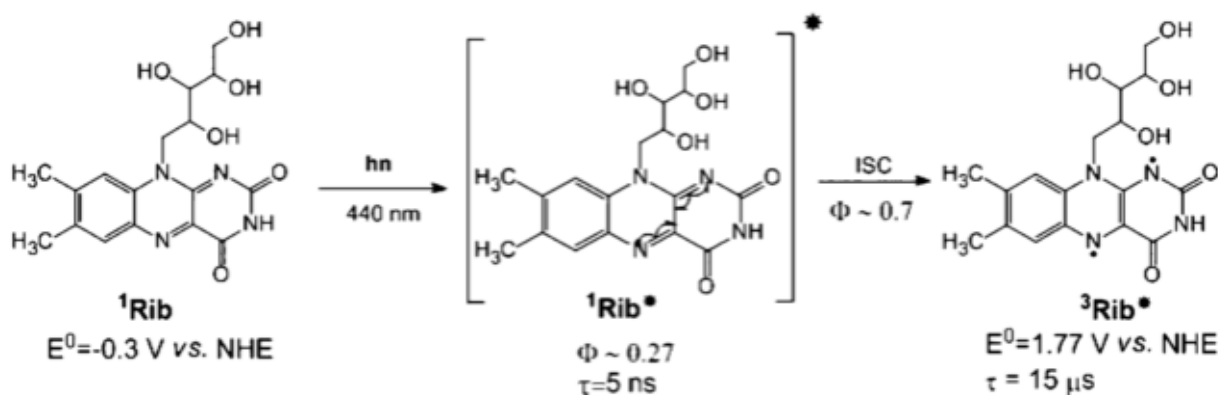


Рисунок 3. Механізм фотоактивації рибофлавіну

Рибофлавін за класом токсичності Food and Drugs Administration (FDA) віднесено до "GRAS" (зазвичай вважається безпечним), і широко розповсюджений в різних природних харчових продуктах та людській крові. Тому, ані рибофлавін, ані продукти його метаболізму не потрібно видаляти після обробки методом СІП. Багато досліджень показали ефективність цієї технології при інактивації широкого спектру патогенних мікроорганізмів (бактерій, вірусів та найпростіших тощо). Метод Mirasol (Terumo BCT, США), заснований на технології Riboflavin / UVB СІП, використовується у багатьох центрах крові у більшості країн світу [305].

Переваги СІП включають: (а) методи СІП є особливо ефективними для запобігання бактеріальним інфекціям, пов'язаним з трансфузією; (б) методи СІП в глобальному масштабі зменшують ризик передачі захворювань через переливання крові та замінюють γ -опромінення для профілактики graft versus host disease (GvHD); (в) гемостатична ефективність СІП, зберігається впродовж довготривалого періоду.

У дослідженні, проведеному Castrillo та співавт. [306], СІП за методикою Mirasol, продемонстрував мінімальну втрату параметрів якості тромбоцитів.

Мінімальне зменшення закручування було відзначено на 7-й день зберігання, що вказує на те, що морфологія клітин зберігається у всіх популяціях клітин.

Дослідження *in vitro* показали, що компоненти крові, що оброблялися СІП, були широко перевірені у світовому масштабі, і ефективність цього методу має значне статистично достовірне підтвердження. Також було показано достовірні переваги цього методу: експресія активованого рецептора фібриногену, як виявляється, збільшується після СІП, можливо, через прямий вплив СІП на цей інтегрин. Ці дані стосуються в основному методу амодален / УФА та, меншою мірою, методу рибофлавіну/УФ [307].

СІП для обробки компонентів крові є наступним кроком для усунення загрози захворювань, що передаються трансфузійно. Проте, для успішної реалізації цих заходів у всьому світі потрібна збалансована взаємодія різних факторів. Одним із найважливіших критеріїв застосування цих методів є економічна обґрунтованість та можливість здійснення більш широкого застосування, особливо в умовах високих вимог та обмежених ресурсів, як це спостерігається в країнах, що розвиваються. Проте нещодавні аналізи показали, що продукти, які лікують гострі розлади тромбоцитоутворення (ГРТ), можуть фактично знизити загальні витрати на охорону здоров'я та тривалість перебування в лікарні, пов'язані з пост-трансфузійною допомогою деяким пацієнтам. Завдяки здатності терапії Mirasol PRT інактивувати всі залишкові лейкоцити у продукті, що опосередковує GvHD, він може бути використаний як альтернатива γ-випромінюванню, що дозволяє заощадити величезні медичні витрати та забезпечити підвищений комфорт та якість самопочуття пацієнта [308].

Крім того, було встановлено, що система Mirasol PRT, яка вважається золотим стандартом для інактивації залишкових лейкоцитів у продуктах крові, запобігає накопиченню та секреції більшості асоційованих з WBC-цитокінів з потенціалом для профілактики лейкоцит-опосередкованих імунологічних реакцій у пацієнтів [308]. Система "Mirasol" є простою у використанні та не потребує спеціальної підготовки для експлуатації обладнання. Ця технологія

дозволяє усунути залишковий ризик для більшості бактерій, а також зменшує ризик, пов'язаний з великим переліком трансфузійних патогенів, на які не проводиться системний контроль при переливанні компонентів крові. Потрібні додаткові дослідження, результати яких необхідні для повного розуміння різноманітних механізмів, що реалізуються при пріонних інфекціях (ПІ), і, отже, ПІ залишається викликом на найближчий час для вчених, що, у свою чергу, вимагає більш узгоджених зусиль для отримання тривалих та стабільних клінічних переваг.

Але вказані вище технології не застосовували для заміни формаліну та мертіолату в вакцинології. Фактична відсутність алергічних реакцій на продукти обробки мікроорганізмів роблять вказану технологію перспективною для застосування у вакцинному виробництві. Саме 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 фотоінактивації, від яких не потрібно очищати вакцину та які не утворюють ковалентних зв'язків з антигенами вакцин.

Мета роботи – створення науково-технічної документації за результатами пошуку інноваційних методів інактивації вірусів.

Результати та їх обговорення.

Нами проведено інформаційно-аналітичний огляд за темою фотодинамічної інактивації біологічних патогенних агентів (БПА) у технологіях виготовлення та застосування імунобіологічних препаратів.

Проблеми інактивації патогенів та імуногенності при розробці вакцин.

Живі вакцини 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. Вакцина 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 холодового 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 [309].

Для отримання інактивованих вакцин збудників позбавляють вірулентних властивостей шляхом нагрівання, обробки формаліном, ацетоном, спиртом і ін. Це забезпечує надійну інактивацію і мінімальне пошкодження структури антигенів, 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.

Інактивовані вакцини в цілому менш ефективні, ніж живі, однак при повторному введенні створюють досить стійкий імунітет. При виробництві інактивованих вакцин необхідно особливу увагу звертати на повноту інактивації вакцин. Субодиночні і спліт-вакцини мають низьку реактогенність, високу ступінь специфічної безпеки і достатню імуногенну активність. Вірусний лізат, який використовується для приготування таких вакцин, 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.

Анатоксини – це екзотоксини різних мікроорганізмів, інактивовані формаліном, такі вакцини зазвичай сорбують на гідроксиді алюмінію. Вони забезпечують формування антитоксичного імунітету (індукування синтезу антитіл проти анатоксинів), який, однак, не запобігає бактеріоносійству.

Рекомбінантні вакцини засновані на застосуванні генно-інженерних продуктів. Вони досить ефективні, безпечні, для їх отримання використовують

високоєфективну сучасну генну технологію. Такі вакцини можуть бути використані для розробки комплексних вакцин, що створюють імунітет одночасно проти декількох інфекцій, але швидка мутація інфекційного чинника в природі призводить до швидкої втрати їх ефективності, тому виробники, наприклад, грипозних вакцин, відмовилися від генно-інженерних антигенів, а застосовують класичні методи з актуальними штамами вірусів.

Вакцини зі штучним ад'ювантом засновані на використанні природних антигенів і синтетичних ад'ювантів. Комбіновані вакцини включають до складу компоненти, що забезпечують створення протективного імунітету проти кількох інфекцій. Найбільш відома серед них АКДП-вакцина, що складається з інактивованих бактерій *Bordetella pertussis* і очищених дифтерійного та правцевого анатоксинів, адсорбованих на гідроксиді алюмінію [310]. В даний час основною проблемою при використанні рекомбінантних, синтетичних і інактивованих вакцин є їх недостатня імуногенність, яка набагато нижче, ніж у попередніх їм живих і цілюноклітинних вакцин. Як ми писали вище, інактивація збудника та/або токсина формаліном чи пропіолактоном призводить не тільки до зменшення імуногенності на порядки, 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. Для виключення вказаних вище недоліків необхідно виключити утворення ковалентних зв'язків між модифікатором та антигеном - мішенню – токсином або збудником. При цьому інактивація повинна бути вельми ефективною.

Окрім своєї ключової ролі в забезпеченні клітинного метаболізму у людей та тварин за допомогою дієтичних добавок, рибофлавін як фотосенсибілізатор використовується в системах дезінфекції, що забезпечує антимікробну дію. Цей метод дезінфекції, при якому застосовується фотосенсибілізатор, називається антимікробною фотодинамічною терапією.

Антимікробна фотодинамічна терапія (aPDT) є перспективним підходом щодо фотоінактивації збудників у крові та похідних крові. Повідомлялося, що

перевага антимікробної фотодинамічної терапії полягає в тому, що до неї немає стійких штамів. На сьогодні затверджено три фотосенсибілізатори: метиленовий синій (MB) для плазми та рибофлавін і амотосален для плазми та тромбоцитів [311].

Фотохімічні механізми, що застосовуються у фотодинамічній терапії

У своєму основному стані молекула фотосенсибілізатора (PS) є синглетом, оскільки вона має два електрони з протилежними спінами. 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 триплетнего 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 триплетнего 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 синглетнего 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 реакції 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 ($O_2 \bullet^-$). Дисмутація або одноелектронне відновлення $O_2 \bullet^-$ дає пероксид водню (H_2O_2), який, у свою чергу, може зазнати іншого одноелектронного відновлення,

утворюючи потужний окислювач – гідроксильні радикали ($\text{HO} \bullet$). 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 (рис. 4) [312, 313].

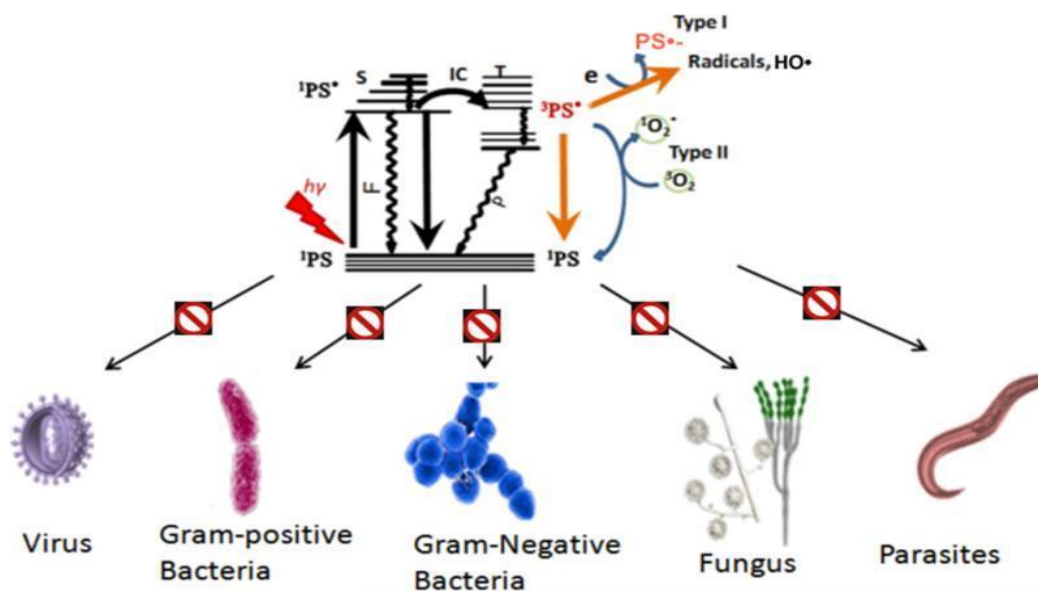


Рисунок 4. Діаграма Яблонського, що показує фотохімічні шляхи в aPDI.

Примітка. Основний стан ^1PS (фотосенсибілізатор) поглинає фотон, утворюючи збуджений синглетний стан $^1\text{PS}^*$, який може зазнати міжсистемного схрещування (IC), утворюючи триплетний стан $^3\text{PS}^*$. Цей довгожителі може переносити енергію (тип II) з утворенням із молекулярного кисню $^3\text{O}_2$ синглетного кисню $^1\text{O}_2^*$ або перенесення електронів (тип I) з утворенням гідроксильних радикалів $\text{HO} \bullet$. Обидва ці АФК здатні вбивати широкий спектр патогенів.

Флавіни є речовинами, здатними до фотомодифікації, тобто здатні 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 [314]. У той же час, біологічно нерегульований фотонно-збуджений стан флавінів в ультрафіолетово-синій (УФ-синій) спектральній смузі може призвести до утворення або синглетного кисню ($^1\text{O}_2$) через перенесення енергії до кисню навколишнього середовища (тип II), або водню пероксиду та похідних за допомогою радикалізації (тип I) (АФК).

Антибіотикогенна властивість рибофлавіну відома давно і використовується для противірусної та антибактеріальної дезінфекції; для зміцнення тканини рогівки при фоторефракційній хірургії за допомогою ROS-індукованого зшивання колагену [315, 316].

Рибофлавін завдяки наявності різних мезоатомів має чудові фотофізичні та фотохімічні властивості. Кілька досліджень показують, що фотоактивований рибофлавін виробляє АФК [317, 318]. Рибофлавін поглинає фотони після опромінення світлом і зазнає міжсистемного перетворення, тобто із синглетного стану в триплетний. Цей триплетний стан реагує з молекулярним киснем, утворюючи тим самим АФК. Згенерований АФК атакує клітинні макромолекули і руйнує цілісність мембрани, тим самим вбиваючи мікроорганізм.

Дослідження Khan S. та співавторів продемонстрували антимікробний фотодинамічний потенціал рибофлавіну, опроміненого білим світлом протягом 2 год, за допомогою дослідної моделі з кишковою паличкою. Оброблені бактеріальні клітини демонстрували рясне 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). Також спостерігалось помітне зменшення колонієутворюючих одиниць *E. coli*, що було підтверджено додатково оптичними мікроскопічними та SEM-зображеннями шляхом реєстрації загибелі бактерій. Таким чином, це дослідження показує, що фотоосвітлений рибофлавін перетворює окислювально-відновний статус бактеріальних клітин у скомпрометований стан, який призводить до значного пошкодження мембрани, що в кінцевому підсумку спричиняє загибель бактерій. Активність супероксиддисмутази (SOD) та каталази істотно знижена у зразках, які піддаються фотоосвітленому рибофлавіну, порівняно із зразками, які піддаються впливу рибофлавіну без світла та впливу лише 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 дії збудженого світлом рибофлавіну. Це дослідження показує ще один аспект до використання фотоактивованого рибофлавіну, демонструючи, що клінічно важливі мультирезистентні бактерії чутливі до АФК, що генерується фотоактивованим рибофлавіном [319].

Дослідження Maisch T. та співавторів [320] показує, що синтезовані похідні флавіну можуть бути використані як фотосенсибілізатори для місцевого застосування для деколонізації бактеріями шкіри та слизової. Синтезовані похідні флавіну показали високий квантовий вихід синглетного кисню приблизно 75 %. Високорезистентні бактерії, такі як MRSA (стійкий до метициліну золотистий стафілокок), EHEC (ентерогеморагічна кишкова паличка), синьогнійна паличка та *Acinetobacter baumannii*, інкубували з похідними флавіну *in vitro* і згодом опромінювали видимим світлом лише протягом декількох секунд. Після опромінення кількість життєздатних бактерій зменшилась до $6 \log_{10}$ залежно від концентрації похідних флавіну та світлового дозування. Бактерицидна дія фотоактивованого рибофлавіну не залежала від типу бактерій та відповідної картини стійкості до антибіотиків. На відміну від цього, концентрація фотосенсибілізатора та параметри світла, що використовуються для знищення бактерій, не впливали на життєздатність клітин кератиноцитів людини (терапевтичне вікно). Таким чином, дослідження показує, що мультирезистентні бактерії можна безпечно та ефективно знищити комбінацією модифікованих молекул вітаміну B2, кисню та видимого світла, тоді як нормальні клітини шкіри виживають [320].

Thakuri P. та співавтори показали в своєму дослідженні, що коли рибофлавін збуджувався синім світлом, він був здатний вбивати *S. aureus* та *P. aeruginosa* [321]. У дослідженні O'Rourke J. було показано аналогічний ефект фотоактивованого рибофлавіну на *Bacillus subtilis* [322].

У дослідженні Makdoui K. та співавторів рибофлавін посилював антибактеріальну дію на дослідний штам MRSA для двох різних довжин хвиль

синього світла - 412 та 450 нм. Використовуючи вищу дозу, зменшення КУО становило 99 % та 98 % відповідно для світла 412 та 450 нм. Бактерицидна ефективність була високою також у глибокому шарі рідини (93 %, вища доза). Ці результати свідчать про те, що синє світло можна розглянути для можливого впровадження при глибоких інфекціях рогівки [323].

Також було показано, що рибофлавін / УФА та попередня обробка амфотерицином В були ефективними проти таких грибкових збудників, як *C. albicans*, *Fusarium* sp. та *A. fumigatus*, які можуть спричинити інфекційний кератомікоз [324].

Але під час дослідження Tuncann G. та співавторів, де формування біоплівки та антибіоплівкову активність оцінювали за допомогою різних фотосенсибілізаторів та типів опромінення, було помічено, що 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. 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* [325].

Рибофлавін як фотосенсибілізатор при інактивації вірусів

Вітамін В₂, активований УФО або видимим світлом, також застосовується як засіб, що зв'язує нуклеїнові кислоти, для використання для фотоінактивації таких патогенів, як віруси, що містять нуклеїнові кислоти та знаходяться в плазмі, тромбоцитах та еритроцитах. 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 (HBV), вірус псевдосказу [326, 327].

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, (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 [328].

Щодо ризику трансфузійної трансмісії, дослідження Keil S.D. та інших показало, 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 [329].

Ще одне дослідження стосується технології знищення вірусів, що використовується для знезараження крові та плазми. У цьому дослідженні була отримана плазма від відновлених пацієнтів після зараження Ебола вірусом (EBOV), яка називається "реконвалесцентною плазмою", і є ефективним засобом лікування хворих доступним в ендемічних районах. Тоді як цей тип плазми несе ризик інтродукції інших патогенів, в тому числі для інших штамів EBOV він знижує рівень життєздатних патогенів, при цьому не змінює рівень захисних антитіл та цільної крові людини ($\geq 3,0$ -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 [330, 331].

Рибофлавін як частина технології фотосенсибілізації для зниження навантаження патогенами

Таким чином, система «рибофлавін + UVB» знайшла своє застосування в технології зменшення навантаження патогенами - система «Mirasol» ®

Технологія зменшення збудника (PRT) («Terumo BCT Inc.», Лейквуд, США), яка використовується для стерилізації крові та плазми для переливання [332].

Отримано велику кількість доказів антимікробної активності «рибофлавін + УФВ», фокус уваги перейшов до безпеки його застосування та деяких можливих змін, які можуть відбутися в тромбоцитах та плазмі.

Дослідження Abonnenc M. та інших виявило, що оброблені Mirasol® тромбоцити проявляють здатність до більшого терміну зберігання у порівнянні з контролем (збільшення маркерів активації та швидкості гліколізу, нижчий гіпотонічний шок та реакції активації подвійних агоністів та зниження загальної антиоксидантної здатності). Автори також підтвердили, що лише УФ-випромінювання викликає ураження тромбоцитів. Рибофлавін же виконує внутрішньоклітинну захисну роль, тоді як позаклітинний антиоксидантний захист патогенів він зменшує. У цьому дослідженні були виявлені деякі переваги розчинів добавок при зберіганні тромбоцитів, що містять калій і магній, які підтвердили зменшення ступеня руйнування еритроцитів протягом зберігання [333].

У новому дослідженні Hermida-Nogueira та співавторів було виявлено велику кількість білків, пов'язаних з активацією тромбоцитів та ураженням тромбоцитів, які можуть відігравати роль у можливих побічних реакціях трансфузії. У цьому дослідженні було виявлено, що на 7-й день зберігання після обробки «Мірасолом»® 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. Крім того, виявлено, що інші глікопротеїни та маркери активації тромбоцитів були підвищеними на 7-й день. Білки, пов'язані з гліколізом та виробленням лактату, виявилися значно зміненими, що демонструє дерегуляцію метаболізму тромбоцитів на 7-й день. Отримані результати дають нову інформацію про можливі впливи EV тромбоцитів на побічні реакції при переливанні.

Рибофлавін як засіб фотодинамічній терапії раку

Вважалося, що рибофлавін є перспективним протипухлинним засобом у фотодинамічній терапії, хоча подальше застосування методу було обмежене незрозумілим молекулярним механізмом. Одна із статей показує, що рибофлавін здатний розпізнавати невідповідність G-T і ефективно опромінювати одноланцюгові розриви в дуплексних ДНК-мішенях. 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. Більше того, рибофлавін є перспективною сполукою для подальшого проектування лікарських засобів завдяки властивому йому специфічному визнанню невідповідності G – T [334].

Кілька досліджень показали, що ФДТ-опосередкована цитотоксичність виникає трьома шляхами: апоптотична, некротична та пов'язана з аутофагією загибель клітин. Деякі висновки показують, що методи ФДТ, які діють шляхом індукування апоптотичної загибелі клітин, приводять до виділення високоімуногенних продуктів та відповідно можуть стимулювати протипухлинний імунітет [335].

У дослідженні Акасова Р. та співавторів водорозчинна форма рибофлавіну - флавіновий мононуклеотид (ФМН) – була показана як перспективний засіб для фотодинамічної терапії меланоми. Опромінення синім світлом з дозою 5 Дж/см² клітин меланоми, які попередньо пройшли інкубацію з ФМН, призвело до загибелі клітин через апоптоз. Таким чином, значення IC₅₀ 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. Регресія ксенотрансплантата меланоми у мишей спостерігалася в результаті внутрішньовенного введення ФМН з подальшим опроміненням синім світлом ділянки пухлини. Інгібування росту пухлини становило 85-90 % протягом 50 днів після лікування ФДТ [336].

Зшивання колагену рогівки з рибофлавіном як фотодинамічна терапія при лікуванні інфекційного кератиту

Інфекційний кератит - захворювання рогівки ока, яке потенційно здатне призводити до сліпоти. Окрім антимікробних препаратів, використання зшивального колагену рогівки (CXL) шляхом фотодинамічної терапії (ФДТ) також розглядається як потенційна альтернатива при лікуванні інфекційного кератиту [337, 338]. Таким чином, CXL також був описаний як рибофлавін-UVA-фотодинамічна інактивація (рибофлавін-UVA-PDI) [339].

Скаат А. та співавтори представили дані, коли додаткове застосування фотохімічної терапії рибофлавіном / UVA позитивно впливає на рефрактерний інфекційний кератит. 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 швидке зменшення симптомів та зменшення розміру інфільтрату після фотохімічної терапії рибофлавіном / UVA. Ознаки інфекції та запалення здебільшого проходять протягом 1-2 тижнів після лікування. Незважаючи на таку терапію, у одного пацієнта стан продовжував погіршуватися, і була проведена кератопластика. Зазначено, що лікування ФДТ є безпечним та ефективним, і його слід розглядати як частину терапії першої лінії у важких випадках інфекційного кератиту [340].

Дослідження Song X. та інших 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/см²) під час впливу 0,1 % рибофлавіну та 20 % декстрану. Результати показують, що через 24 години після поперечного зв'язування CXL знижується життєздатність, запускається апоптоз та інгібується проліферація, без впливу на мультипотентну трансформацію гемопоетичних стовбурових клітин та міофібробластичну

трансформацію кератоцитів КС. CXL запускає секрецію FGFb кератоцитів КС тимчасово (5 годин), нормалізуючись через 24 години [341].

Імунологічні аспекти створення вакцин на основі фотоінактивованих патогенів

Зазвичай вакцинальний імунітет прийнято оцінювати за гуморальною, специфічною відповіддю, а саме – рівнем захисних імуноглобулінів до інфекційного агента. Але формування адаптивного імунітету, специфічної імунної відповіді цілком обумовлено і залежить від адекватної реакції природного імунітету. Природний імунітет – давній захист організму від інфекційних агентів, першим реагує і здатний створювати пришвидшену неспецифічну відповідь на мікробний агент. Розпізнавання патогенів клітинами-ефекторами природженого імунітету відбувається за допомогою образ-розпізнавальних рецепторів (pattern-recognition receptors – PRRs), які взаємодіють з консервативними структурами мікроорганізмів (ЛПС, пептидогліканами, ліпотейхоєвою кислотою, ssPHK та dsPHK та ін.), так званими патоген-асоційованими молекулярними структурами (PAMPs) [342, 343].

Серед PRRs найбільшу увагу привертають Toll-подібні рецептори (TLRs), що експресуються ефекторними клітинами природженого імунітету. Після зв'язування з лігандами TLRs взаємодіють з клітинними адаптерними молекулами і починають передачу сигналу Т-лімфоцитам. Найважливішою частиною механізму дії бактеріальних лігандів, маркером відповіді на антиген є посилення проліферації і функціональної активності клітин-ефекторів. Ключовими елементами ефекторних механізмів виступають дендритні клітини (DC) і натуральні кілери (NK). DC забезпечують розпізнавання, процесинг патогенів та антигенне представлення їх у складі молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) Т-лімфоцитам. Для здійснення цих функцій DC продукують цитокіни, ко-стимуляторні адгезивні молекули, молекули антиген представлення. Під час виконання своїх функцій DC забезпечують взаємозв'язок природженого і придбаного імунітету і програмують диференціювання Т-лімфоцитів за Th1- або Th2-типом [344, 345].

Таким чином, перед впровадженням інактиваторів, які не утворюють з антигеном ковалентних зв'язків, необхідно, окрім синтезу найбільш активних речовин, іще дослідити фундаментальні закономірності фотоінактивації мікроорганізмів-мішеней. Наприклад, вплив часу опромінення на зміни інфекційності патогенів. Без такої інформації, в подальшому для ефективної інактивації продуцентів вакцин неможливо ефективно розрахувати співвідношення інактиватора, інтенсивності опромінення та кількості самого інфекційного чинника. Окрім того, невідомими є метаболіти після руйнування самого інактиватора. Вказані дослідження дозволять зрозуміти прогнозованість і перспективність заміни ковалентних інактиваторів на засоби фотодинамічної інактивації бактерій в вакцинології з метою подальшого впровадження при розробці нових класів нетоксичних та неалергенних вакцин.

Узагальнюючі результати інформаційно-аналітичного дослідження зазначимо, що системи інактивації патогенів за допомогою фотодинамічного впливу є перспективним та альтернативним методом заміни традиційних способів, що використовуються у технологіях одержання імунобіологічних препаратів.