

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)
Отдел учебно-методической работы

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет»

Межрегиональная общественная организация
«Союз специалистов медицинской биофотоники»

Никонов С. Д., Гельфонд М.Л.,
Соколов Е. Г., Рогачев М. В.

**Фотодинамическая терапия
в профилактике и лечении
новой коронавирусной инфекции (COVID-19)**

**Посвящается памяти
Марка Львовича Гельфонда**

Учебное пособие

Санкт-Петербург
2023

ДК:615.831:616.98:578.834.1(07)

ББК:53.54я7

Никонов С. Д., Гельфонд М. Л., Соколов Е. Г., Рогачев М. В. Фотодинамическая терапия в профилактике и лечении новой коронавирусной инфекции (COVID-19): учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2023. – 112 с.

ISBN 978-5-6046979-0-0

Посвящается памяти Марка Львовича Гельфонда

Рецензент: доктор медицинских наук, профессор А. Ф. Урманчеева, врач-онколог хирургического онкогинекологического отделения, ведущий научный сотрудник научного отделения онкогинекологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Учебное пособие посвящено памяти Марка Львовича Гельфонда, доктора медицинских наук, старшего научного сотрудника научного отделения торакальной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, человека неиссякаемой энергии и специалиста высочайшего класса, внесшего огромный вклад в развитие фотодинамической терапии. Под его руководством лазерные технологии были широко внедрены в практику медицинских организаций Северо-Западного региона России для лечения местно-распространенного рака трахеи и бронхов, мезотелиомы плевры, базальноклеточного рака кожи, рака пищевода, мочевого пузыря, головного мозга, тяжелой дисплазии шейки матки, для лечения папилломавирусной инфекции и других заболеваний. Марк Львович, являясь автором более 150 научных работ, в том числе 23 патентов на изобретения, всегда щедро делился своим опытом с коллегами и учениками, поэтому глубоко символично, что его последняя научная работа публикуется как учебное пособие.

В учебном пособии представлены исторические предпосылки и научное обоснование возможностей фотодинамической терапии в качестве перспективной стратегии борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными бактериями, грибами, вирусами и простейшими, а также результаты оригинальных научных исследований и описание технологии клинического применения фотодинамической терапии в лечении и профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

Учебное пособие предназначено для врачей-специалистов, сталкивающихся в своей практике с диагностикой и лечением новой коронавирусной инфекции (COVID-19), интересующихся вопросами фотодинамической терапии, а также для обучающихся по программам высшего и дополнительного профессионального образования.

Утверждено в качестве учебного пособия
Ученым советом ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
протокол № 12 от 25 октября 2022 г.

© Никонов С. Д. Коллектив авторов, 2023

ISBN 978-5-6046979-0-0

Содержание

Список сокращений	5
Введение	6
Глава 1. Исторические предпосылки и принципы антибактериальной фотодинамической терапии	8
1.1. От гелиотерапии к фототерапии	8
1.2. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов и вирусов	11
1.3. Предпосылки к использованию фотодинамической терапии для лечения и профилактики новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19)	19
Глава 2. Экспериментальное обоснование эффективности фотодинамической терапии в лечении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19)	24
2.1. Фотодинамическая инактивация SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	24
2.1.1. Культивирование и ростовая среда	25
2.1.2. Инактивация вирусной взвеси лазерным облучением	25
2.1.3. Лазерное воздействие на клеточную культуру	26
2.1.4. Ингибирование репликации вируса	26
2.1.5. Полученные результаты	27
2.1.6. Обсуждение	32
2.2. Патогенетические аспекты фотодинамической инактивации вируса SARS-CoV-2	35
2.3. Параметры лазерного излучения для экстракорпорального генерирования противовирусного фотодинамического эффекта	39
Глава 3. Клиническая апробация технологии антиковидной фотодинамической терапии для профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19)	53
3.1. Эффективность фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	54
3.2. Эффективность фотодинамической терапии больных с легким и среднетяжелым течением заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)	58

3.3. Эффективность экстракорпоральной светодиодной фотодинамической терапии с целью реабилитации реконвалесцентов с выраженными остаточными изменениями в легких после перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	59
3.4. Возможности повышения эффективности фотодинамической инактивации SARS-CoV-2	61
Глава 4. Технология фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	64
4.1. Противопоказания к фотодинамической профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	64
4.2. Материально-техническое оснащение метода фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	64
4.3. Методика проведения фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	65
4.4. Сочетанные лечебно-оздоровительные эффекты фотодинамической профилактики COVID-19	71
4.5. Критерии оценки эффективности фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)	71
Глава 5. Технология фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2	73
5.1. Противопоказания к фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2	73
5.2. Методика проведения фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2	73
Заключение	79
Приложение. Постановление бюро секции медико-биологических наук отделения медицинских наук РАН от 23.11.2020	80
Контрольные вопросы	81
Тестовые задания	83
Список литературы	94

Список сокращений

АПФ2	– ангиотензин-превращающий фермент 2 типа
АФК	– активные формы кислорода
ВГА	– вирус гепатита А
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ВПГ	– вирус простого герпеса
ВПЧ	– вирус папилломы человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВЛ	– искусственная вентиляция легких
ИФА	– иммуноферментный анализ
МС	– метиленовый синий
ОРДС	– острый респираторный дистресс-синдром
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РХ	– радахлорин®
ФДТ	– фотодинамическая терапия
ФС	– фотосенсибилизатор
ХОБЛ	– хроническая обструктивная болезнь легких
MERS	– Middle East respiratory syndrome (Ближневосточный респираторный синдром, БВРС)
SARS-CoV-2	– Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом)
COVID-19	– новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2
SARS-CoV-2	
CPE	– Cytopathic effect (цитопатический эффект)

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является одним из перспективных методов лечения онкологических, неонкологических и инфекционных заболеваний, принцип действия которой основан на динамическом взаимодействии между фотосенсибилизатором, светом с определенной длиной волны и молекулярным кислородом, что способствует избирательному разрушению ткани-мишени.

Широкое распространение ФДТ получила в качестве минимально инвазивного метода органосохраняющего лечения некоторых злокачественных новообразований и предраковых заболеваний.

ФДТ имеет ряд потенциальных преимуществ перед хирургией и лучевой терапией: она относительно малотравматична, обеспечивает практически прецизионную фокусировку, повторное воздействие не ограничено общей дозой, а процесс заживления происходит без грубого рубцевания.

В сравнении с традиционной химиотерапией ФДТ обладает большей локализованностью и селективностью воздействия. Избирательное разрушение опухоли достигается применением фотосенсибилизаторов, селективно накапливающихся в опухолевых клетках-мишенях, с последующим облучением низкоэнергетическим лазером, исключая неконтролируемое повреждение здоровых тканей.

ФДТ может проводиться как по радикальной, так и по паллиативной программам. Возможна ее комбинация с химио-, иммуно- и лучевой терапией.

ФДТ обычно можно проводить амбулаторно или в условиях дневного стационара, она удобна для пациента и не имеет побочных эффектов.

С другой стороны, одной из 10 глобальных проблем в области здравоохранения Всемирная Организация Здравоохранения объявила устойчивость к антибиотикам, и для борьбы с резистентными бактериями необходимо разрабатывать новые антибактериальные подходы. Многочисленными исследованиями было показано, что фотодинамическая инактивация чрезвычайно эффективна в отношении широкого спектра патогенов, включая лекарственно устойчивые бактерии, вирусы, грибы и простейшие.

ФДТ также успешно инактивирует провоспалительные цитокины, стимулирует синтез коллагена и эластина, способствуя снижению активности воспалительного процесса и ускорению заживления.

Фотодинамическая инактивация сохраняет эффективность после многократных повторных обработок, значительно снижая вероятность формирования лекарственной резистентности. Эти свойства позволяют рассматривать ФДТ в качестве перспективного стратегического направления в борьбе с инфекциями.

Глобальное распространение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) несмотря на доступные вакцины, антитела и противовирусные препараты по-прежнему сопровождается тяжелым течением заболевания и высокой летальностью. Текущие варианты лечения сохраняют ограничения, а появление новых мутаций представляет собой новую проблему.

Фотодинамическая инактивация, являясь потенциальным средством лечения инфекций, вызванных широким спектром критических патогенов, включая вирусы, может стать одним из важнейших компонентов новых стратегий лечения и мер профилактики, в том числе нацеленных на возбудителя новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Глава 1.

Исторические предпосылки и принципы антибактериальной фотодинамической терапии

Рассмотрим исторические предпосылки и основные принципы антибактериальной фотодинамической терапии.

1.1. От гелиотерапии к фототерапии

ФДТ является альтернативным минимально инвазивным методом лечения ряда онкологических, инфекционных и иных заболеваний, который в последние два десятилетия привлекает все больший интерес медицинского сообщества. В частности, успехи ФДТ вызвали ренессанс научных исследований в онкологии. По сравнению с традиционными химиотерапевтическими методами лечения ФДТ обладает большей селективностью в отношении некоторых опухолей благодаря использованию фотосенсибилизаторов (ФС), способных избирательно накапливаться в опухолевых клетках, что с учетом отсутствия фототоксических эффектов ФС является перспективным направлением дальнейших научных исследований [Маркевич П.С. с соавт., 2019; Hamblin M.R., Huang Y. (ed.), 2017; Correia J.H., 2021; Algorri J.F. et al., 2021; Kar B. et al., 2023].

Фотодинамическая терапия, являющаяся разделом лазерной медицины, базируется на фотохимическом и фотофизическом воздействии на клетки фотосенсибилизаторов и низкоэнергетических квантовых генераторов. К группе низкоинтенсивных принято относить установки, создающие спектральный световой поток, не превышающий величины естественной солнечной радиации, поэтому предшественниками этого современного вида лечения заболеваний вполне обоснованно можно считать гелиотерапию (от греч. *hēlios* солнце – *therapeia* лечение) [Буйлин В.А. с соавт, 2004; Москвин С.В., 2016; Boulnois J.-L., 1986].

Возможно, самое раннее упоминание о солнечном свете в качестве лечебного средства относится ко временам египетских фараонов – более 5000 г. до н. э. – о чем свидетельствуют изображения, археологические находки и артефакты [Alpert J.S., 2015; Algorri J.F. et al.,

2021; Britannica, 2022].

На известном древнеегипетском артефакте изображена семья, подвергающаяся целительным лучам солнца (рис. 1). Сохранились записи, свидетельствующие, что таким способом египтяне успешно лечили хронические язвы.



Рис. 1. Царь Эхнатон (слева) с женой, царицей Нефертити и тремя дочерьми под лучами бога солнца Атона [Britannica, 2022].

Примечания: Алтарный рельеф, сер. 14 в. до н.э., Государственный музей Берлина.

В целом почитание солнца и признание его целебной силы остается культурной практикой в большей части Африки до сих пор. Лечебные солнечные ванны были обычным явлением не только в Древнем Египте, Ассирии и Месопотамии, где возводили солнечные сады, но и в Древней Греции и Риме [McDonagh A. F., 2001; Alpert J.S., 2015; Enwemeke C.S. et al., 2020; Britannica, 2022].

Греки и римляне признавали исцеляющую силу солнца: «Sol est

remediogum maximum» (пер. с лат.: солнце – лучшее лекарство) – провозгласил Плиний, поэтому широкое распространение получило строительство соляриев и гелиосов, все римские термы были оборудованы соляриями для принятия солнечных ванн, санаторий Гиппократ на острове Кос был оборудован большим солярием.

Геродот составил подробные инструкции по применению солнечных ванн, подчеркивая их благоприятное действие на укрепление мышц и нервов. Регулярные в течение нескольких месяцев инсоляции были введены в обязательную программу подготовки спортсменов к Олимпийским играм [Ackroyd R. et al., 2001; McDonagh A. F., 2001; Alpert J.S., 2015; Shelton H. M., 2019; Britannica, 2022].

В индийской священной книге Атхарва Веда (1400 г. до н.э.) описан способ лечения проказы и лейкодермы (витилиго) с использованием комбинации солнечного света и светочувствительных трав, содержащих фурукумарины (*Eclipta prostrata*, *Coloc path* *Curcuma longa*), который фактически является фотодинамической терапией. Выделенный в 1947 году из сорнякового растения Сныть обыкновенная (*Ammi majus*) фотосенсибилизатор метоксален в сочетании с ультрафиолетовым облучением успешно применяется сегодня для лечения псориаза, красного плоского лишая, витилиго, грибовидного микоза, Т-клеточной лимфомы кожи [Fitzpatrick T.B., Pathak M.A., 1959; Abdel-kader M.H., 2016].

В древнекитайских трактатах описаны техники лечения бесплодия с помощью цветных листов бумаги и солнечного света у мужчин, а лунного света у женщин [Needham J., 1974; McDonagh A.F., 2001]. Таким образом, сведения из многих частей мира демонстрируют широкое использование энергии солнечных лучей для эмпирического лечения различных заболеваний без учета вредных эффектов ультрафиолетового излучения, которые были неизвестны вплоть до открытия ультрафиолетовых лучей в 1801 году [Barth J., 1987; Abdel-kader M.H., 2016].

Открытие ультрафиолетового излучения фактически дало толчок новому направлению научных исследований, а изобретение искусственных источников ультрафиолетового излучения положило начало клинической фототерапии.

В течение XIX-XX веков было открыто стимулирующее действие

ультрафиолетового излучения на выработку витамина D, обнаружены бактерицидные свойства в отношении широкого спектра бактерий, вирусов и грибов, в том числе возбудителей сибирской язвы, туберкулеза, сифилиса, проказы и гриппа.

В 1903 году Нильсу Рюбергу Финзену была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины, которой он был удостоен за разработку метода лечения туберкулеза кожи с использованием ультрафиолетового света: «В знак признания его вклада в лечение болезней, особенно вульгарной (туберкулезной) волчанки, с помощью концентрированного светового излучения, благодаря чему он открыл новый путь для медицинской науки» – было написано в заключении Нобелевского комитета.

Фототерапия получила международное научное признание. Вплоть до открытия антибиотиков ультрафиолетовое облучение зачастую являлось единственным методом лечения заболеваний, вызванных инфекционным агентом [Маркевич П.С. с соавт., 2019; Grzybowski A. et al., 2016; The Nobel Prize, 2022].

Таким образом, с древних времен свет играл значительную роль в процессе сохранения здоровья и борьбы с болезнями. Несмотря на ограниченный успех древней медицины в лечении отдельных состояний с помощью света, наибольшее развитие фототерапии произошло в конце XIX – начале XX веков.

Созданные в этот период технические изобретения и научные обоснования открыли путь для динамичного развития фототерапии и перехода гелиотерапии в сторону искусственных и более сложных диапазонов светового излучения.

1.2. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов и вирусов

Фотодинамическая терапия является хорошо зарекомендовавшим себя альтернативным методом лечения ряда онкологических и предраковых заболеваний, однако исторически фотодинамический эффект был впервые продемонстрирован против бактерий более 120 лет назад [Abdel-Kader M.H., 2016; Aroso R.T. et al., 2021; The Nobel

Prize, 2022].

В XXI веке Всемирная Организация Здравоохранения объявила проблему устойчивости к противомикробным препаратам одной из десяти стоящих перед человечеством глобальных угроз здоровью населения, связанную прежде всего с чрезмерным использованием антибиотиков.

Эта проблема порождает не только значительный экономический ущерб, но и создает серьезную угрозу успехам современной медицины в лечении инфекций, в том числе при выполнении сложных хирургических операций и проведении противоопухолевой химиотерапии [Fotinos N., 2008; O'Neill J., 2014; Shallcross L.J., Davies S., 2014; Aroso R. T. et al., 2021; WHO, 2022].

Предсказанное «окончание эры антибиотиков» [Nordmann P. et al., 2011] возродило исследовательский интерес к ФДТ в качестве потенциальной альтернативы противомикробной терапии, особенно для лечения инфекций с множественной лекарственной устойчивостью, включая грибковые и вирусные. Было доказано, что противомикробная ФДТ, также известная как фотоактивируемая дезинфекция, фотодинамическая инактивация, фотодинамическая противомикробная химиотерапия или летальная фотосенсибилизация, эффективно уничтожает лекарственно-устойчивые микроорганизмы, включая биопленки, как в лабораторных, так и в клинических условиях [Бредихин Д.А. с соавт., 2018; Maisch T., 2009; Liu Y. et al., 2015; Amin R.M. et al., 2016; Yunsong Z. et al., 2016; Wainwright M. et al., 2017; Aroso R.T. et al., 2021; Warriar A., 2021].

Фотодинамическая инактивация представляет собой простой и контролируемый метод противомикробного воздействия, основанный на продукции активных форм кислорода – свободных радикалов и синглетного кислорода (АФК). Эта технология требует комбинированного воздействия кислорода, света и фотосенсибилизатора (ФС), который поглощает и использует энергию света для образования этих АФК (рис. 2) [DeRosa M.C., 2002; Costa L., Faustino M.A., 2012].

Генерация активных форм кислорода может происходить двумя альтернативными путями после активации светом фотосенсибилизатора. ФС может поглощать фотон в основном состоянии, образуя возбужденное синглетное состояние.

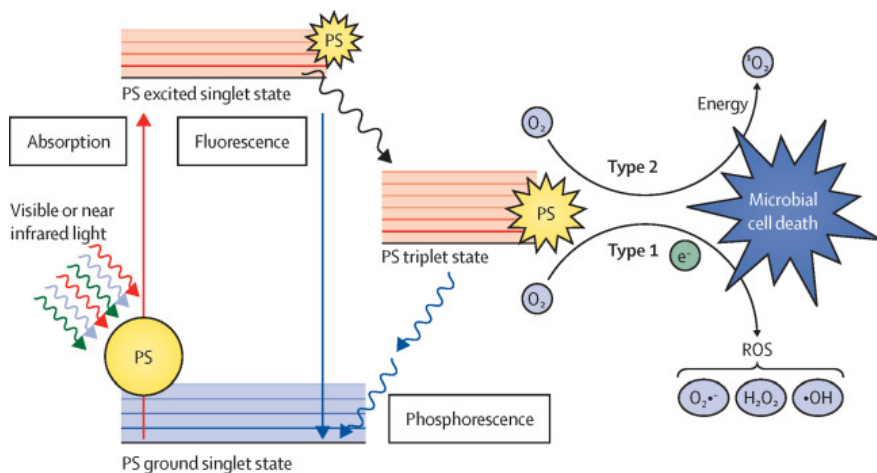


Рис. 2. Механизм антимикробного действия ФДТ [Wainwright M. et al., 2017].

Примечания: $O_2^{\cdot-}$ = супероксидные анионы; $\cdot OH$ = гидроксильный радикал; H_2O_2 = перекись водорода; 1O_2 = синглетный кислород; e^- = электрон; PS = фотосенсибилизатор.

Это состояние может подвергаться интеркомбинационному переходу в более долгоживущее триплетное состояние, которое может взаимодействовать с кислородом по двум механизмам:

- в типе 1 – генерация $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ и H_2O_2 путем переноса электрона от возбужденного ФС;

- в типе 2 – триплетное состояние ФС может непосредственно подвергаться энергетическому обмену с триплетным кислородом в основном состоянии, что приводит к образованию синглетного кислорода 1O_2 .

Генерируемые активные формы кислорода быстро реагируют со своим окружением в зависимости от локализации возбужденного ФС, например, с клеточными стенками микроорганизмов, липидными мембранами, пептидами и нуклеиновыми кислотами. После этого цикла фотосенсибилизатор возвращается в исходное состояние, готовый поглотить новый фотон и генерировать дополнительные АФК [Lauro F.M. et al., 2002; Leanne B.J., Ross W.B., 2008; Wainwright M. et al., 2017; Aroso R.T. et al., 2021].

Поскольку ФДТ вызывает необратимое повреждение белков и липидов, она также влияет на экспрессию факторов вирулентности, таких как протеазы, альфа-гемолизин, сфингомиелиназа и липополисахариды. Уничтожение факторов вирулентности имеет чрезвычайно важное значение, поскольку они могут секретироваться микроорганизмом в период непосредственно инфекционного процесса, а также в отсутствие инфекции, например, в случае токсемии, нанося серьезный ущерб хозяину [Kömerik N. et al., 2000; Tubby S. et al., 2009; Bartolomeu V. et al., 2016; Tan Y. et al., 2018; Almeda A. et al., 2020].

Важным преимуществом антимикробной ФДТ перед антибиотиками является то, что к фотосенсибилизаторам не развивается резистентность, поэтому повторные применения ФДТ не приводят к селекции резистентных штаммов [Lauro F.M. et al., 2002; Heger M., 2015; Aroso R. T. et al., 2021]. Это обусловлено несколькими причинами.

Во-первых, основными мишенями фотодинамического воздействия являются внешние микробные структуры, такие как клеточная стенка, клеточная мембрана или капсид и оболочка вируса [Almeida A. et al., 2011].

Поскольку основными мишенями фотодинамической инактивации являются внешние структуры, ФС не нужно проникать внутрь микроорганизма. Специфической и адекватной адгезии ФС к внешним структурам достаточно для разрушения при активации светом. Таким образом, целевые микроорганизмы не имеют возможности развить резистентность за счет прекращения поглощения или увеличения метаболической детоксикации или оттока лекарственного средства [Pucelik B., Dąbrowski J.M., 2022].

Во-вторых, ФС в терапевтической дозе не проявляют выраженной токсичности, в результате чего бактериям не приходится вырабатывать адаптивные механизмы выживания против ФС. Бактериям также трудно «почувствовать», что окислительный стресс исходит от нетоксичного в других отношениях ФС, поэтому любые метаболические адаптации направлены на что-то другое (например, механизм антиоксидантной защиты).

В-третьих, бактериальные клетки слишком повреждены в результате ФДТ, что не позволяет им обеспечить адаптивность между поколениями. Кроме того, в отличие от антибиотиков ФДТ не нацелена на

какой-то конкретный участок бактерии или внутриклеточный процесс. АФК, генерируемые ФДТ, нацелены на различные структуры бактериальных клеток и различные метаболические пути, а интервал между введением ФС и ФДТ слишком короток, чтобы у бактерий даже теоретически успела развиться резистентность [Странадко Е.Ф. с соавт., 2010; Josefsen L.B., Boyle R.W., 2008; Costa L. et al., 2011; Heger M., 2015; Almeida A. et al., 2020].

В настоящее время опубликован ряд статей о возможных механизмах формирования микроорганизмами устойчивости к ФДТ, но до сих пор нет сообщений о фактическом приобретении бактериями устойчивости к ФДТ [Странадко Е.Ф. с соавт., 2010; Wainwright M., 1998; Jori G. et al., 2006; Zolfaghari P.S. et al., 2009; Lyon J.P. et al., 2011; Maisch T. et al., 2011; Kashef N., Hamblin M.R., 2017; Pérez-Laguna V. et al., 2018; Almeida A., 2020; Oyim J. et al., 2021].

Среди микроорганизмов, которые могут быть инактивированы воздействием ФДТ, вирусы, возможно, являются наиболее уязвимыми, поскольку могут быть инактивированы путем повреждения молекул капсида, оболочки (липиды, углеводы, белки) или нуклеиновых кислот (рис. 3).

Пространственно для реакции I типа требуется, чтобы ФС находился в пределах субнанометрового расстояния от вируса, тогда как реакции II типа допускают диффузию синглетного кислорода при расстоянии более 100 нм [Mohr H. et al. 1995; Baptista M.S. et al. 2017].

Фотодинамическое повреждение липидных и белковых структур вирусной оболочки приводит к утрате патогенности вирусов, предотвращает инфицирование клеток и репликацию вирусов. Причем оболочечные вирусы инактивируются быстрее, чем безоболочечные [Lambrecht B., 1991; Käsermann F., Kempf C., 1997; Costa L., Faustino M.A., 2012].

Фотодинамическая инактивация вирусов была открыта в 30-х годах XX века, но только в последние 30 лет в связи с созданием новых ФС и разработкой современных источников монохроматичной световой энергии (портативные лазеры и сверхяркие светодиоды), фотодинамические методы инактивации вирусов получили новый импульс развития [Kimberlin D.W., Whitley R.J., 1996; Costa L., Faustino M.A., 2012; Sabino C.P. et al., 2020].

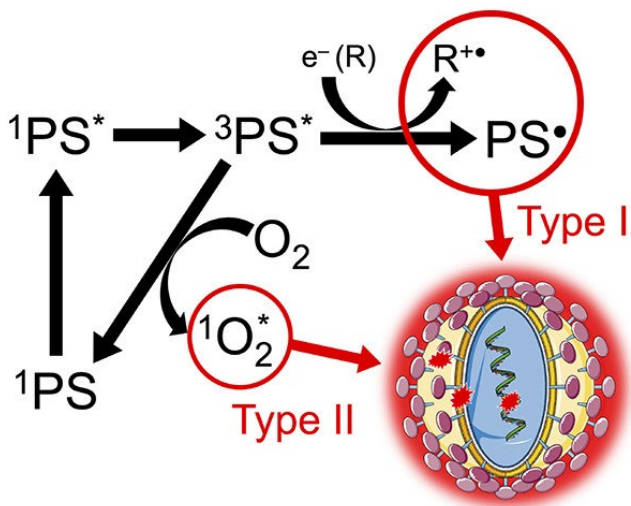


Рис. 3. Механизм противовирусного действия ФДТ [Sabino C.P. et al., 2020].

Примечания: $^1O_2^*$ – синглетный кислород; e^- – электрон; PS – фотосенсибилизатор; 1PS – синглетно-возбужденное состояние; 3PS – триплетно-возбужденное состояние.

Проведенные исследования убедительно показали эффективность ФДТ в лечении вирусных инфекций, вызванных вирусом папилломы (ВПЧ), вирусом гепатита А (ВГА) и вирусом простого герпеса (ВПГ), Эбола, коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [Shikowitz M.J. et al., 1998; Casteel M. et al., 2004; Tardivo J.P. et al., 2012], ВИЧ [Owada T. et al. 2000].

Кроме того, технология фотодинамической дезинфекции (в некоторых нормативных документах патоген-редукция) препаратов крови уже несколько десятилетий используется гематологической службой.

Из фотосенсибилизаторов наибольшее распространение для экстракорпоральной фотоинактивации коронавирусов и других клинически значимых патогенов получил метиленовый синий [Judy M.M., 1990; Wagner S.J., 2002; Wainwright M., 2002; Marciel L. et al., 2017; Blázquez E. et al., 2019; Eickmann M. et al., 2020; Jin C. et al., 2021; Mariewskaya K.A. et al., 2021].

В Российской Федерации зарегистрированы и внедрены медицинские технологии бактерицидной лазерной ФДТ раневых инфекций, бактериальных инфекций ротовой полости, вульгарных угрей, вирусной инаktivации донорской плазмы [Бредихин Д.А. с соавт., 2018].

Большинство фотосенсибилизаторов, используемых в ФДТ, относятся к порфиринам [Гельфонд М.Л., 2007; Milgrom L.R., 1997; Macdonald I.J., Dougherty T.J., 2001, O'Connor A.E. et al., 2009].

Эти хромофоры и их аналоги, такие, как хлорины и бактериохлорины, участвуют в важных биологических функциях, таких как дыхание (гем-группа) и фотосинтез (хлорофилл и бактериохлорофилл). На основе порфиринов разработаны синтетические аналоги (фталоцианины, тексафирины, порфицены, сапфирины), которые оказались перспективными ФС [Гельфонд М.Л., 2007; Josefsen L.B., Boyle R., 2008; W. McCarthy J.R. et al., 2009; O'Connor A.E. et al., 2009; Kar B. et al., 2023].

Во многих исследованиях для ФДТ-инаktivации вирусов применены природный гиперидин или синтетические красители – толуидиновый синий О, розовый бенгальский, эозин, метиленовый синий [Sobotta L. et al., 2015].

Существует разница в селективности механизма фотоповреждения вирусов: сахарные фрагменты больше атакуются радикалами при первом типе фотоактивации, а остатки гуанина являются мишенями синглетного кислорода, сгенерированного с помощью второго типа фотоактивации. Из четырех оснований ДНК гуанин является единственным, способным окисляться синглетным кислородом (реакция II типа) [Baptista M.S. et al. 2017].

Обработка вирусов метиленовым синим и другими гетероциклическими красителями приводит к повреждению вирусной ДНК, либо к модификации или потере основания, а также к разрывам одной нити (SSB), либо перекрестным связям ДНК с белками [Abe H., Wagner S.J., 1995; Floyd R.A. et al., 2004, Costa L. et al., 2012; Steinmann E. et al., 2013; Svyatchenko V.A. et al., 2021; Wainwright M., 2021; Arentz J., von der Heide H.J., 2022].

Катионные порфирины могут связываться с нуклеиновыми кис-

лотами путем интеркаляции в пары оснований или самонакладки, вызывая повреждения при фотоинактивации из-за легкого окисления остатков гуанина [Ванг К. с соавт., 1999; Fiel R.J., 1989; Cho S.Y. et al., 2020].

При противовирусной ФДТ метиленовым синим критической структурой-мишенью является ДНК вирусов. Так ДНК, выделенная из аденовируса, обработанного метиленовым синим, продемонстрировала при Саузерн-блот-(Southern blot)-анализе лишь случайные фрагменты ДНК [Schagen F.H.E. et al., 1999].

При лечении вируса простого герпеса с помощью метиленового синего и ФДТ доказано повреждение ДНК и блокада репликации ДНК [Müller-Breitkreutz K., Mohr H., 1997].

Короткоживущие активные формы кислорода (АФК) ответственны за повреждение таких вирусных мишеней, как липиды и белки оболочки, капсидные и основные белки и нуклеиновая кислота. Эти субстраты вируса, атакованные синглетным кислородом и/или другими АФК (перекись водорода, супероксид-анион и гидроксильные радикалы), необратимо повреждаются, и вирус утрачивает болезнетворность ввиду блокирования репликации. АФК разрушают нуклеиновые кислоты, особенно в гуаниновых остатках, что предотвращает вирусную репликацию [Bachmann B. et al., 1995; Costa L. et al., 2012; Wiehe A. et al., 2019; Sabino C.P. et al., 2020; Wainwright M., 2021].

Для РНК-содержащих вирусов главной мишенью при фотодинамической инактивации со многими фотосенсибилизаторами является РНК, при этом доказательств прямой корреляции между повреждением РНК и потерей инфекционности пока не получено [Costa L. et al., 2012; Ziganshyna S. et al., 2022].

Хотя с помощью ФДТ можно нейтрализовать все типы вирусов, эффективность инактивации зависит как от свойств фотосенсибилизатора, так и от самого вируса [Floyd R.A. et al., 2004; Costa L. et al., 2012; Nikolaeva-Glomb L. et al., 2017]. Как правило, вирусы РНК-типа легче фотоинактивируются, чем их аналоги ДНК-типа, что позволяет предположить, что SARS-CoV-2, который представляет собой оболочечный вирус РНК-типа, может быть успешно нейтрализован с помощью ФДТ [Floyd R.A. et al., 2004; Costa L., Tomé J. P., 2012].

Таким образом, фотодинамическая инактивация вирусов может стать в будущем альтернативой традиционным противовирусным технологиям ввиду быстродействия, беспрецедентной экономичности и экологичности. Важнейшими параметрами для успешной фотоинактивации являются концентрация фотосенсибилизаторов, спектральные характеристики лазерных и светодиодных источников света при соблюдении плотности энергии и мощности излучения.

1.3. Предпосылки к использованию фотодинамической терапии для лечения и профилактики новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19)

По данным Всемирной Организации Здравоохранения по состоянию на 10 марта 2023 года было зарегистрировано более 759 миллионов подтвержденных случаев заболевания [Mathieu E., 2022]. На сегодняшний день пандемия унесла примерно 6,9 миллиона жизней [WHO COVID-19 Dashboard, 2023].

Новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2, включена в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих [Постановление Правительства Российской Федерации, 2020].

Ведущим путем передачи SARS-CoV-2 является воздушно-капельный, а медицинские работники подвергаются самому высокому риску инфицирования, поскольку в процессе выполнения профессиональных обязанностей имеют длительный аэрозольный контакт [BMP COVID-19, 2022; Chirico F., 2020; Remuzzi A., 2020; Therapeutics and COVID-19, 2022].

Предполагается, что первичная репликация вируса происходит в эпителии слизистой оболочки верхних дыхательных путей с дальнейшим размножением в нижних дыхательных путях и слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта [Transmission of SARS-CoV-2, 2022], поэтому основным подходом к терапии COVID-19 должно быть упреждающее назначение лечения до развития полного симптомокомплекса жизнеугрожающих состояний, а именно пневмонии, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), сепсиса [Хикматуллаева А.С. с соавт., 2020; Москвин С.В. с соавт., 2021; BMP COVID-19, 2022].

Взаимодействие между рецепторами и вирусами является ключевым фактором, определяющим круг хозяев. Первичным рецептором входа в клетку для SARS-CoV-2 является мембранный белок, ангиотензин-превращающий фермент 2 типа (АПФ2). АПФ2 в основном экспрессируется в слизистой оболочке носа, бронхах, легких, сердце, пищеводе, почках, желудке, мочевом пузыре и подвздошной кишке, поэтому все эти органы восприимчивы к SARS-CoV-2 [Fekrazad R., 2020; Hoffmann M. et al., 2020; Zhang H.L. et al., 2021].

Установлено, что у человека АПФ2 имеет сродство к S-гликопротеинам некоторых коронавирусов, включая вирусы SARS-CoV и SARS-CoV-2 и служит функциональным рецептором для проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетку-мишень (рис. 4) [Agata J. et al., 2006; Huang C. et al., 2020; Kai H., Kai M., 2020; Kipshidze N. et al., 2020; Walls A.C. et al., 2020; Wu Z., Mc Googan J.M., 2020; Mariewskaya K.A. et al., 2021; Zhang H.L. et al., 2021].

Трансмембранный шиповидный гликопротеин вируса (S-белок, или SARS-CoV-S) связывается с АПФ2 в клеточной мембране, таким образом вирус прикрепляется к клетке-мишени, затем поверхностные протеазы клетки, воздействуя на белок SARS-CoV-S, приводят к слиянию вируса с мембраной клетки хозяина. В результате этого SARS-CoV-2 попадает внутрь клетки-мишени, где происходит его репликация [Kai H., Kai M., 2020; Zhou P. et al., 2020; Rahman M.M. et al., 2021].

У мышей, зараженных SARS-CoV-2 в рамках эксперимента, инфекция вызывала острое повреждение легких и поражение легочной паренхимы, для которого были характерны утолщение стенок альвеол, повышение проницаемости легочных сосудов и инфильтрация воспалительными клетками [Hoffmann M. et al., 2020].

После инфекции SARS-CoV-2 у мышей содержание белка АПФ2 в легких значительно снижалось, тогда как уровень АПФ оставался неизменным [Hoffmann M. et al., 2020].

Предполагается, что инфекция SARS-CoV-2, подавляя АПФ2, может приводить к избыточному токсическому накоплению ангиотензина II и брадикинина, что вызывает острый респираторный дистресс-синдром, отёк лёгких и миокардит [Rahman M.M. et al., 2021; Daniell H. et al., 2022].

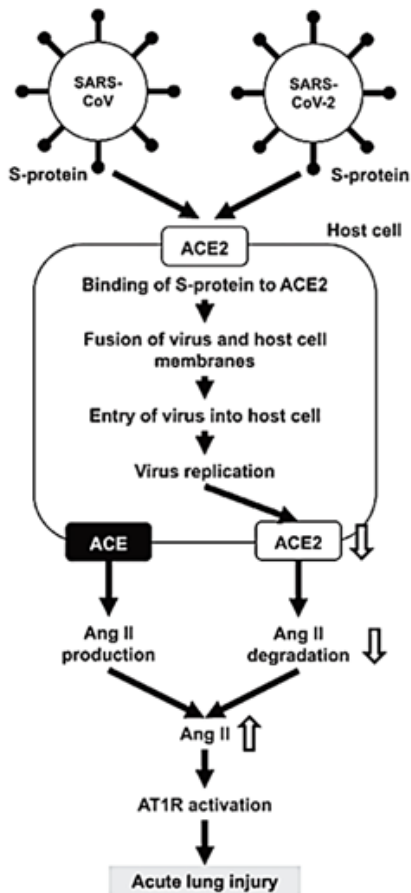


Рис. 4. Патогенез развития ОРДС при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [Kai H., Kai M., 2020].

Примечания: *S-protein* – шиповидный гликопротеин вируса; *ACE* – ангиотензин-превращающий фермент (АПФ); *AngII* – ангиотензин 2; *AT1R* – ингибитор АПФ1.

Эти данные согласуются с ранее отмеченным наблюдением, что коронавирусы специфично подавляют экспрессию АПФ2 в клетках хозяина, а степень подавления зависит от репликации вируса [Sukumaran V. et al., 2012; Kai H., Kai M., 2020].

С точки зрения патофизиологии в течении COVID-19 выделяют два основных периода: в начале заболевания клинические проявления в основном обусловлены репликацией SARS-CoV-2, позже клиническая картина, по-видимому, обусловлена нерегулируемым иммунным/воспалительным ответом на SARS-CoV-2, что приводит к повреждению тканей.

Основываясь на этом понимании, ожидается, что терапия, направленная непосредственно на SARS-CoV-2, будет иметь наибольший эффект на ранних стадиях заболевания, в то время как иммуносупрессивная/противовоспалительная терапия, вероятно, будет более эффективной на более поздних стадиях COVID-19 [Coronavirus Disease, 2022].

Пандемия COVID-19 вызвала взрыв как научных исследований, так и дезинформации, продемонстрировав востребованность надежных, доступных и регулярно обновляемых руководств для оперативного размещения новых результатов исследований, рекомендованных к использованию в клинической практике [Москвин С.В. с соавт., 2021; BMP COVID-19, 2022; Lotfi M., 2020; Naci H. et al., 2020; de Matos V.T.L. et al., 2021; Daniell H. et al., 2022; Pires L. et al., 2022; Translational feasibility, 2022; Therapeutics and COVID-19, 2022].

Вакцинация является одним из величайших медицинских достижений современной цивилизации и безусловно является наиболее эффективным, безопасным и экономичным средством первичной профилактики опасных для жизни инфекционных заболеваний. При этом также следует отметить, что недоверие к вакцинации внесено в список десяти современных проблем здравоохранения, над которыми работает ВОЗ [Gualano M.R. et al., 2019; Bolze A. et al., 2021; Li Y. et al., 2021; Lythgoe K.A. et al., 2021].

Эффективная вакцина может предотвратить заражение, заболевание или передачу вируса, при этом исход инфекции SARS-CoV-2 у людей неоднороден и зависит от множества факторов, включая возраст, пол, этническую принадлежность и сопутствующие заболевания. Потребуется еще достаточно много времени, чтобы эффективные вакцины стали доступны для всего населения мира и всех людей, подлежащих вакцинации. Кроме того, даже для вакцинированных людей со-

храняется неопределенность в отношении продолжительности пост-вакцинального иммунитета, эффективности существующих вакцин, а также эффективности предварительно изученных методов лечения COVID-19 против новых вариантов и подвариантов SARS-CoV-2 [Cho N.J., Glenn J.S., 2020; Lotfi M., 2020; Hodgson S.H., 2021; Volz E. et al., 2021; Mathieu E., 2023; Therapeutics and COVID-19, 2022; WHO COVID-19 Dashboard, 2023].

Ограничения вышеперечисленных и иных используемых лечебных и профилактических мероприятий демонстрируют сохраняющуюся актуальность и необходимость продолжения поиска эффективных методов лечения COVID-19.

С учетом рассмотренных механизмов фотодинамической инактивации вирусов, полученных знаний о биологических свойствах SARS-CoV-2 и патогенеза развития вызванной им инфекции COVID-19, одним из перспективных направлений исследования в лечении новой коронавирусной инфекции (COVID-19) является изучение возможностей ФДТ для предотвращения инфицирования клеток хозяина и блокирование репликации вируса SARS-CoV-2 [Москвин С.В., 2016; Лазер и ковид, 2020; Москвин С.В. с соавт., 2021; Floyd R. A. et al., 2004; Cho N.J., Glenn J.S., 2020; Hanna R. et al., 2020; Sabino C.P. et al., 2020; Mariewskaya K.A. et al., 2021; Arentz J., von der Heide H.J., 2022; Pires L. et al., 2022; Ziganshyna S. et al., 2022].

Использование ФДТ в борьбе с SARS-CoV-2 может стать альтернативным подходом, который заслуживает изучения. ФДТ уже одобрена и используется для лечения рака, предраковых и неонкологических заболеваний.

Кроме того, за последние несколько лет было показано, что этот подход очень эффективен против всех типов микроорганизмов, таких как грамположительные и грамотрицательные бактерии, в том числе против лекарственно резистентных форм и пленок, грибов, простейших и вирусов.

Этот широкий спектр активности ФДТ является перспективным в отношении вновь возникающих инфекционных заболеваний, таких, например, как COVID-19.

Глава 2.

Экспериментальное обоснование эффективности фотодинамической терапии в лечении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19)

Для обоснования эффективности фотодинамической терапии в лечении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19), был проведен комплекс экспериментальных исследований.

2.1. Фотодинамическая инактивация SARS-CoV-2 *in vitro*

Начало исследования датировано 25 мая 2020 года, когда в вирусологической лаборатории Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) стартовало поисковое исследование по оценке эффективности фотодинамической инактивации SARS-CoV-2 *in vitro* с использованием разрешенных к клиническому применению в Российской Федерации фотосенсибилизаторов (ФС) – метиленового синего (МС) и радахлорина® (РХ).

Исследования выполнены в лаборатории четвертого уровня биологической безопасности (BSL-4), сертифицированной для работы с патогенами, которые могут вызывать смертельные заболевания.

В исследовании использовали вирусный штамм RP/2020 SARS-CoV-2 (коллекция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Исследования проведены В.А. Святченко, В.Б. Локтевым (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), С.Д. Никоновым (ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»), А.П. Майоровым (ФГБУН Институт лазерной физики СО РАН) и М.Л. Гельфондом (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России).

2.1.1. Культивирование и ростовая среда

Культивация вируса проводилась в монослое клеток почки зеленой мартышки Vero E6 в питательной среде Игла MEM с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки и 40 мкг/мл сульфата гентамицина.

Инфекционную активность вирусных суспензий определяли с использованием метода инфекционной дозы 50% тканевой культуры TCID₅₀ (количество вирусов, которые будут вызывать цитопатический эффект в 50% инокулированных культур) [Chanas A.C. et al., 1976].

2.1.2. Инактивация вирусной взвеси лазерным облучением

Лазерное воздействие на вирусную суспензию и монослойную культуру клеток осуществляли непрерывным монопозиционным излучением, генерируемым полупроводниковым лазерным генератором Лахта Милон (Квалитек, Россия) с длиной волны $\lambda = 662$ нм.

Исследование проводили в световом боксе, в который помещали пластиковые пробирки с вирусными суспензиями или культуральные флаконы и планшеты для работы с адгезивными культурами клеток (TC treated) с монослоями клеточных культур.

Для ФДТ продолжительностью 40 и 100 секунд с учетом эффективной мощности лазера 350 мВт были использованы два режима дозирования со средней плотностью дозы излучения 16 Дж/см² и 40 Дж/см².

ФС различной концентрации готовили путем разбавления исходного 1% водного раствора MC (10,0 мг/мл) и 0,35% водного раствора PX (35,0 мг/мл) в питательной среде Игла MEM.

Для изучения прямой инактивации SARS-CoV-2 *in vitro* с помощью ФДТ с MC и PX 0,2 мл вирусных суспензий, содержащих 10³TCID₅₀ SARS-CoV-2, переносили в микропробирки объемом 1,5 мл и добавляли равные объемы фотосенсибилизаторов в культуральную среду.

Сразу после добавления одну половину образцов обрабатывали

лазерным излучением.

Были изучены группы образцов, которые подвергались облучению со средней плотностью дозы излучения 16 Дж/см^2 и 40 Дж/см^2 при экспозиции 40 и 100 секунд. После лазерного воздействия проводили инфицирование содержимым пробирок монослойной культуры клеток Vero E6, культивируемых в микролунках, для анализа воздействия ФДТ на вирус.

2.1.3. Лазерное воздействие на клеточную культуру

Для оценки фотодинамического воздействия на репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 субконфлюэнтные монослои в пластиковых культуральных флаконах инфицировали 10^2 - 10^5 TCID₅₀ вирусной смеси, добавляли ФС, после чего производили обработку флаконов с культурой лазерным светом со средней плотностью дозы излучения 40 Дж/см^2 и мощностью 350 мВт.

В качестве контроля использовали образцы, содержащие добавленные ФС без лазерного облучения, образцы, подвергнутые лазерному облучению без добавления ФС, и образцы без ФС и без световой обработки.

2.1.4. Ингибирование репликации вируса

Противовирусное действие ФДТ на суспензии, содержащие SARS-CoV-2, определяли через 48 ч после заражения. Для этого инфицированные культуры клеток Vero E6 инкубировали в 96-луночных клеточных пластиковых планшетах при 37°C в CO_2 -инкубаторе в полной темноте.

Через 2 дня после инфицирования вирус-индуцированный цитопатический эффект (CPE) оценивали с помощью микроскопии и подтверждали с помощью колориметрического теста оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест) на основе формазана (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид) [Nikš M., Otto M., 1990].

Для индикации противовирусной активности фотосенсибилизаторов использовали IC_{50} (концентрация соединения, вызывающая 50% ингибирование репликации вируса), который определяли с помощью микроскопической оценки CPE и МТТ-теста на основе формазана [Кирилюк И.А. с соавт., 2012].

Для этого клетки высевали в 96-луночный планшет для микротитрования с плоским дном при плотности 5×10^4 клеток/лунку; через 24 ч инкубации монослои клеток инфицировали SARS-CoV-2 ($10^2 TCID_{50}$ /лунка), а разведения ФС добавляли к клеткам сразу или через 3,5 ч после заражения; через 48 ч инкубации культуральную среду заменяли на свежую.

В каждую лунку добавляли по 10 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл в фосфатном буферном растворе) и инкубировали планшет в течение 4 ч при 37°C; затем среду отсасывали и солибилизировали образовавшиеся кристаллы формазана добавлением 50 мкл диметилсульфоксида на лунку в течение 30 мин при 37°C; интенсивность оптической плотности количественно определяли с использованием планшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при 540 нм.

Цитотоксичность выражали в виде CC_{50} (концентрация соединения, вызывающая 50% цитотоксический эффект), которую оценивали с помощью МТТ-теста.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы SPSS Statistics версия 12.0 (SPSS, США). Для оценки достоверности различий количественных признаков использовался метод сравнения относительных частот и t-критерий Стьюдента. Различия в средних значениях считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

2.1.5. Полученные результаты

Рассмотрим результаты применения фотодинамической терапии для лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).

Инактивация SARS-CoV-2

ФДТ против 10^3 TCID₅₀ суспензий SARS-CoV-2 со средней плотностью дозы излучения 16 Дж/см² и 40 Дж/см² полностью инактивировала вирусы в исследуемых суспензиях в присутствии ФС, использованных в диапазоне концентраций 1,0-10,0 мкг/мл для МС и 0,5-5,0 мкг/мл для РХ (рис. 5).

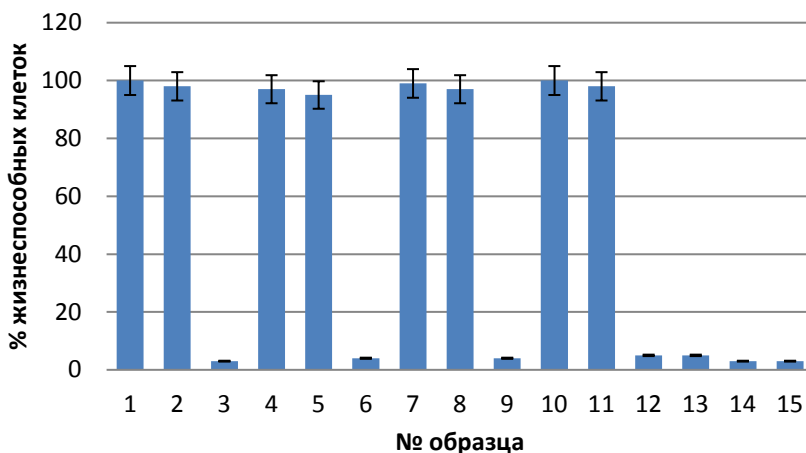


Рис. 5. Фотодинамическая инактивация SARS-CoV-2 в вирусосодержащих суспензиях в присутствии метиленового синего (МС) и радахлорина® (РХ) при мощности лазерного излучения 350 мВт [оригинальный рисунок].

Примечания:

1. Монослои (2×10^5 клеток в каждой лунке) заражали смесью, содержащей 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, с добавлением МС в концентрации 10,0 мкг/мл с последующим облучением в течение 40 с, средняя плотность дозы излучения 16 Дж/см²;

2. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 10,0 мкг/мл МС, 100 с, 40 Дж/см²;

3. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 10,0 мкг/мл МС, без лазерного облучения;

4. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 1,0 мкг/мл МС, 40 с, 16 Дж/см²;

5. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 1,0 мкг/мл МС, 100 с, 40 Дж/см²;

6. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 1,0 мкг/мл МС, без лазерного облучения;

7. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 5,0 мкг/мл РХ, 40 с, 16 Дж/см²;

8. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 5,0 мкг/мл РХ, 100 с, 40 Дж/см²;

9. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, РХ 5,0 мкг/мл, без лазерного облучения;

10. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 0,5 мкг/мл РХ, 40 с, 16 Дж/см²;

11. 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 0,5 мкг/мл РХ, 100 с, 40 Дж/см²;

12. 10^3TCID_{50} SARS-CoV-2, РХ 0,5 мкг/мл, без лазерного облучения;
13. 10^3TCID_{50} SARS-CoV-2, 40 с, 16 Дж/см²;
14. 10^3TCID_{50} SARS-CoV-2, 100 с, 40 Дж/см²;
15. 10^3TCID_{50} SARS-CoV-2, без лазерного облучения.

При этом воздействие лазером на контрольные группы вирусных суспензий без ФС и применение ФС без лазерного воздействия не привело к достоверному снижению вирус-индуцированного цитопатического эффекта (СРЕ) инфицированных монослойных культур клеток Vero E6.

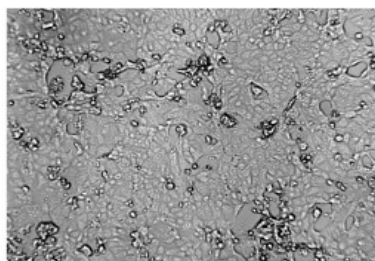
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности ФДТ в инаktivации вирусных суспензий SARS-CoV-2 при одновременном применении низких концентраций ФС, таких как МС и РХ.

Фотодинамическая терапия инфицированных SARS-CoV-2 клеточных культур

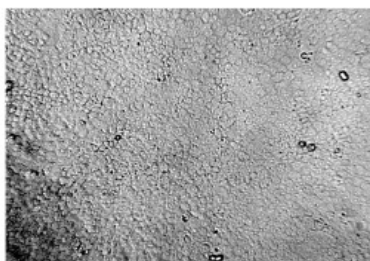
Чтобы оценить влияние ФДТ на репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero E6, субконфлюэнтные монослои в культуральных флаконах инфицировали от 10^2 до 10^5TCID_{50} вирусной смеси с последующим добавлением ФС и проведением ФДТ. На рисунке 6 представлены микрофотографии клеточных монослоев через 2 дня после инфицирования и ФДТ.

Клеточные монослои, инфицированные 10^4 и 10^3TCID_{50} SARS-CoV-2, были полностью защищены после ФДТ с МС, тогда как при заражении клеточных монослоев 10^5TCID_{50} мы наблюдали лишь единичные очаги вирусного поражения. ФДТ в присутствии РХ также полностью ингибировала репликацию вируса в клетках, инфицированных 10^3TCID_{50} и обеспечивала более 50% защиты клеток от 10^4TCID_{50} . Монослои клеток, инфицированные 10^3TCID_{50} в присутствии ФС без лазерного воздействия, были защищены примерно на 15-25%. Мы наблюдали полный цитопатический эффект для контрольных монослоев, инфицированных SARS-CoV-2 в аналогичных дозах.

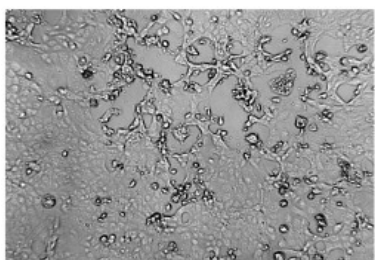
Таким образом, ФДТ с использованием в качестве ФС МС и РХ эффективно ингибирует репликацию вируса в клетках, инфицированных SARS-CoV-2, и может полностью защитить клеточные монослои от вирусного повреждения.



A



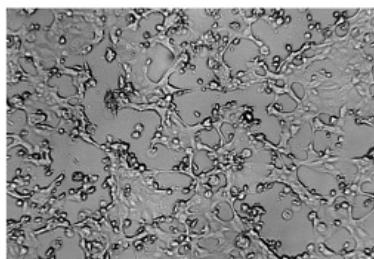
B



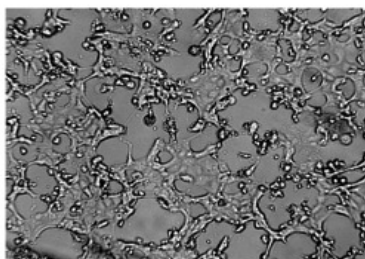
C



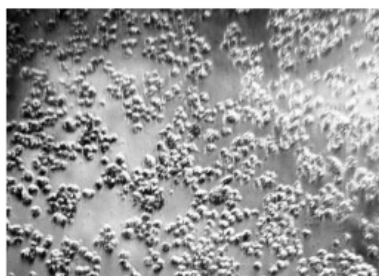
D



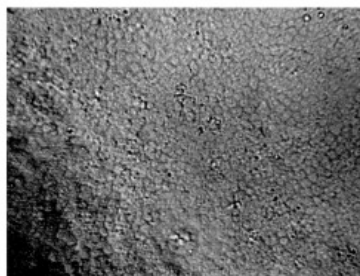
E



F



G



H

Рис. 6. Микрофотографии монослоев Vero E6 (ув. $\times 100$) через 48 ч после заражения SARS-CoV-2 и проведения ФДТ [оригинальный рисунок].

Примечания:

А) клетки Vero E6, инфицированные 10^5 TCID₅₀ суспензии SARS-CoV-2 с последующей обработкой 1,0 мкг/мл метиленовым синим МС и лазерным облучением в течение 100 с, средняя плотность дозы излучения 40 Дж/см²;

В) 10^4 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 1,0 мкг/мл МС, 100 с, 40 Дж/см²;

С) 10^4 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 0,5 мкг/мл РХ, 100 с, 40 Дж/см²;

Д) 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 0,5 мкг/мл РХ, 100 с, 40 Дж/см²;

Е) 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 1,0 мкг/мл МС, без лазерного облучения;

Ф) 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2, 0,5 мкг/мл РХ, без лазерного облучения;

Г) 10^3 TCID₅₀ SARS-CoV-2;

Н) неинфицированный контроль.

Противовирусная активность фотосенсибилизаторов

Исследование противовирусной активности ФС проводили в отсутствие лазерного воздействия. Противовирусную активность ФС определяли в двух вариантах. В первом варианте монослои Vero E6 инфицировали 10^2 TCID₅₀ SARS-CoV-2 и сразу добавляли к клеткам ФС. Во втором ФС добавляли к инфицированным клеткам через 3,5 ч после инфицирования. Анализ результатов показал, что ФС проявляли значительную противовирусную активность в обоих случаях (табл. 1). IC₅₀ (эффeктивная концентрация, ингибирующая 50% вирусов) составляла 0,22 мкг/мл для МС, а терапевтический индекс (отношение CC₅₀ к IC₅₀) превышал 450.

Таблица 1

Противовирусная активность метиленового синего (МС) и радахлорина® (РХ) в клетках Vero E6 без лазерного облучения [оригинальная таблица]

ФС	ФС, добавленный к клеткам вместе с SARS-CoV-2 (IC ₅₀ 50 мкг/мл)	ФС добавленный к клеткам через 3,5 ч после инфицирования SARS-CoV-2 (IC ₅₀ 50 мкг/мл)	CC ₅₀ мкг/мл
МС	0,22 ± 0,07	0,66 ± 0,23	100,0 ± 24,0
РХ	0,33 ± 0,09	2,0 ± 0,60	50,0 ± 15,0

Как видно из таблицы, противовирусная активность МС и РХ

также была обнаружена при добавлении ФС к клеткам спустя значительное время после инфицирования (IC_{50} – 0,66 и 2,0 мкг/мл соответственно).

Этот результат исключает прямую инактивацию вирусных частиц SARS-CoV-2 МС и РХ во внеклеточной среде, поскольку проникновение вирусов в клетки к этому времени уже завершено, а его репликация и выход из клетки еще на произошли. CC_{50} для ФС был значительно выше, чем соответствующий IC_{50} , а терапевтические индексы варьировали от 25 до 150. Эти результаты указывают на то, что ФС потенциально могут быть использованы для успешного лечения коронавирусной инфекции.

2.1.6. Обсуждение

Относительно недавно была сформулирована гипотеза о потенциальной эффективности ФДТ против SARS-CoV-2, а также опубликован краткий отчет о применении ФДТ у человека [Almeida A., 2020; Dias L.D. с соавт., 2020].

Мы изучили возможность использования ФДТ для инактивации SARS-CoV-2 и ингибирования его репликации в монослое чувствительных к вирусу клеток почек зеленой мартышки.

Экспериментальные исследования *in vitro* позволили впервые выявить высокую противовирусную активность ФДТ с ФС МС и РХ в концентрациях в 100-1000 раз ниже, чем указано в инструкциях по их медицинскому применению. Противовирусная активность ФДТ выразилась в прямой инактивации вируса, что обеспечило защиту клеток Vero E6 от инфицирования SARS-CoV-2. Отсутствие вирусных повреждений в клеточных монослоях позволяет предположить, что ФДТ полностью ингибирует репликацию вируса в этих высокочувствительных клетках.

Механизм противовирусной активности ФДТ в отношении SARS-CoV-2 еще нуждается в изучении. Как правило, противовирусный эффект связывают с взаимодействием ФС с капсидом, оболочкой вируса или нуклеиновыми кислотами. ФС активируются светом и затем передают энергию другим молекулам. Кислород обычно действует как акцептор энергии, достигая синглетной формы и запуская

каскад свободнорадикальных реакций, повреждающих биологические структуры вирусов, а также быстро пролиферирующих и злокачественных клеток.

Кроме того, есть сведения о возможной противовирусной активности метиленового синего даже в отсутствие световой активации, поскольку метиленовый синий *in vitro* проявлял вирулицидную активность при инкубации с SARS-CoV-2 [Cagno V. et al., 2021].

Его способность ингибировать белок-белковое взаимодействие спайкового белка в вирусной «короне» SARS-CoV-2 и его рецептора АПФ2, что является первым важным шагом, инициирующим прикрепление и проникновение вируса, может быть механизмом действия, способствующим такой активности.

Дополнительным важным аргументом в пользу перспективы применения метиленового синего является его отличный профиль безопасности и наличие одобрения его применения Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) [Москвин С.В. с соавт., 2021; Drug Approvals and Databases, 2022; EudraPharm, 2022].

Важно отметить, что SARS-CoV-2 – быстро размножающийся коронавирус, который обычно вызывает полный лизис клеток в течение короткого времени. Большой размер вирусной геномной РНК (30000 п.н.) также может быть важным фактором, объясняющим высокую эффективность ФДТ для прямой инактивации вирусных суспензий. Защита обработанных ФС клеточных монослоев от вирусной инфекции (как сразу, так и через 3,5 ч после инфицирования) указывает на то, что ФС может полностью блокировать репликацию вируса в инфицированных клетках в фазе активного вирусного синтеза. Другой возможностью может быть прямая инактивация вирусных частиц, когда они выходят из первично инфицированных клеток.

Патогенез ранних стадий COVID-19 связан с проникновением SARS-CoV-2 в клетки слизистой верхних дыхательных путей и последующим развитием вирусной инфекции в тканях верхних и нижних дыхательных путей, включая респираторные отделы [Liu J. et al., 2020; Lobo C.S. et al., 2022].

Это обеспечивает дальнейшую локальную репликацию вируса в

клетках дыхательных путей и дальнейшее лимфогенное и гематогенное распространение по организму. При этом уровень поражения легких во многом определяет тяжесть течения заболевания и исход болезни.

Эти особенности патогенеза COVID-19 потенцируют использование ФДТ для целенаправленной профилактики и лечения заболевания.

Предлагаемая терапия может быть основана на системах доставки ФС через ирригацию и/или ингаляцию в дыхательные пути. Также хорошо известна возможность доступа как к верхним, так и к нижним дыхательным путям с помощью светового излучения, особенно в красной и ближней инфракрасной областях спектра [El-Hussein A. et al., 2021].

Это говорит о том, что ФДТ может стать высокоэффективным методом профилактики и лечения COVID-19, особенно на ранних стадиях заболевания.

Принципиальным преимуществом данного подхода является то, что его можно использовать при первичной вспышке коронавирусной инфекции для купирования вспышки и профилактики контактного заражения, особенно у бессимптомных пациентов и медицинских работников, оказывающих медицинскую помощь в период пандемии и в специализированных инфекционных отделениях.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности использования ФДТ для лечения новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

Местное использование метиленового синего и радахлорина® путем промывания верхних дыхательных путей или доставки фотосенсибилизатора в нижние дыхательные пути путем ингаляции для инактивации и ингибирования репликации SARS-CoV-2 непосредственно в органах-мишенях являются потенциально многообещающей стратегией для широкого клинического применения в профилактике и лечении COVID-19.

Кроме того, учитывая известные свойства фотосенсибилизаторов подавлять функции различных ферментов, есть основания рассчитывать на фотодинамическую инактивацию рецепторов АПФ2 на мембранах клеток слизистой оболочки дыхательных путей, что может

предотвратить процесс фиксации вирусов и их транспорт в клетки и способствовать профилактике инфицирования здоровых лиц и лиц, имевших контакт с заболевшими COVID-19 [Schikora D. et al., 2020; Weber H.M. et al., 2020; Svyatchenko V.A. et al., 2021; Lobo C.S. et al., 2022].

Результаты проведенного экспериментального исследования для оценки противовирусной активности фотодинамической терапии против SARS-CoV-2 *in vitro* опубликованы в журнале «Photodiagnosis and Photodynamic Therapy» (Journal's Impact IF = 3.577) [Svyatchenko V.A. et al., 2021].

2.2. Патогенетические аспекты фотодинамической инактивации вируса SARS-CoV-2

Для проверки гипотезы о возможности фотодинамической инактивации мембранного белка АПФ2 слизистой оболочкой верхних дыхательных путей было проведено изучение влияния ФДТ на уровень экспрессии АПФ2 в слизистой оболочке языка добровольцев.

Иммуноцитохимические исследования выполнены в лаборатории фармакологически активных соединений (руководитель кандидат биологических наук А.О. Соловьева) Института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

В исследование было включено 5 добровольцев. Исследуемый материал в виде эпителиальных клеток слизистой оболочки корня языка был получен путем соскоба.

От каждого добровольца взяты образцы клеток до воздействия и через 2 часа после обработки полости рта 0,01% раствором МС с последующей ФДТ ($\lambda = 662$ нм, мощность 0,5 Вт, T = 5 мин, средняя плотность дозы излучения 15 Дж/см²). Зондом соскобы наносили на предметные стекла и в течение 10 минут высушивали на воздухе.

Готовый препарат помещали в индивидуальную упаковку и отправляли в лабораторию.

Фиксацию клеток производили инкубированием стекол в 4% растворе параформальдегида в течение 10 минут. Препараты отмывали в натрий-фосфатном буфере (PBS) (Хеликон, Россия), затем для повышения проницаемости мембран пермеабелизировали в 0,3% растворе Triton X-100 (Merck, Германия).

Для снижения вероятности неспецифического связывания клетки в течение часа инкубировали при комнатной температуре в 5% козьей сыворотке (BioWest, Франция), окрашивали первичными антителами к АПФ2 (Abcam, Великобритания) и на ночь оставляли в холодильнике при температуре 5-7°C. На следующий день наносили вторичные антитела к АПФ2, меченные флуоресцентным красителем и связывающиеся с немечеными первичными антителами (Abcam, Великобритания).

Окрашивание ядер осуществляли раствором DAPI (Bio-Rad, США) из расчёта 3 нг/мл, которые, связываясь с аденин-тимин-богатыми участками ДНК, обеспечивали флуоресценцию ядер под микроскопом.

Исследования проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Observer с камерой AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

В эксперименте использовали два красителя: вышеуказанный DAPI (Bio-Rad, США), флуоресцирующий синим цветом при длине волны 461 нм (пик поглощения при $\lambda = 358$ нм), для усиления сигнала и чувствительности Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США), который давал зеленый сигнал с АПФ2 при длине волны 488 нм (пик поглощения при $\lambda = 495$ нм).

Результаты подсчитывались путем оценки уровня флуоресценции клеток с помощью модульной программы обработки и анализа изображений Zeiss Efficient Navigation (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

С каждого стекла при увеличении $\times 60$ случайным образом выбирали по 50 клеток, уровень флуоресценции фиксировали для каждой клетки, результат интерпретировали по среднему значению интенсивности свечения, измеряемого в условных единицах, пропорциональных отклику детектора.

При использовании данной технологии уровень интенсивности

флюоресценции красителей напрямую коррелирует с количеством выявленных «активных» рецепторов АПФ2 на поверхностях исследуемых клеток [Targosz-Korecka M. et al., 2021; Yeung M.L. et al., 2021].

На рисунке 7 представлено графическое отражение результатов исследования влияния фотодинамической терапии на экспрессию рецепторов АПФ2 слизистой оболочки языка через 2 часа после выполнения процедуры.

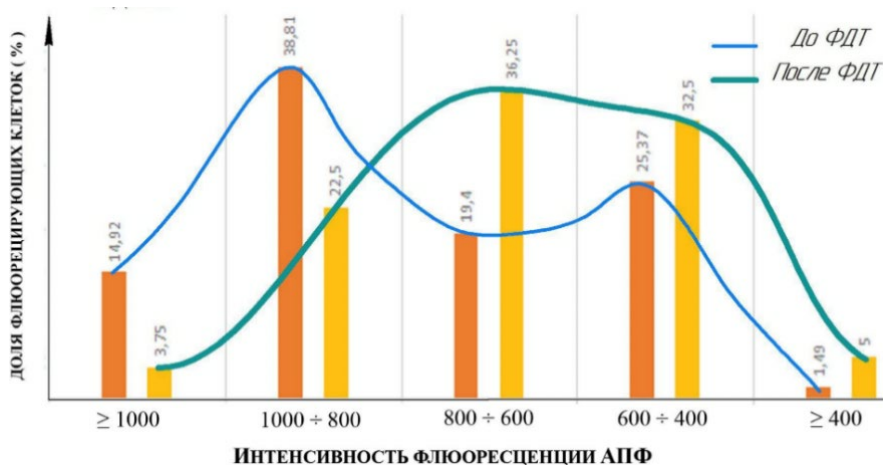


Рис. 7. Интенсивность флюоресценции рецепторов АПФ2 на эпителиоцитах языка больных COVID-19 до и после низкодозной фотодинамической терапии с фотосенсибилизацией слизистой оболочки языка 0,01% раствором метиленового синего [оригинальный рисунок].

На данном графике представлено два распределения. За условную границу мы приняли значение в 800 единиц интенсивности флюоресценции.

Синей линией и оранжевыми столбцами отображены показатели экспрессии АПФ2 на эпителиальных клетках языка до ФДТ, а зелёной кривой и желтыми столбцами – после ФДТ. Так, до ФДТ более половины клеток (53,73%) флюоресцировали более, чем на 800 единиц интенсивности, в то время как после ФДТ количество таких клеток снизилось вдвое (26,25%), и в целом произошёл значимый сдвиг всего пула клеток в сторону возрастания доли клеток с пониженной плотностью

рецепторов АПФ2, что свидетельствует в пользу сформулированной научной гипотезы о возможности фотодинамической инактивации мембранного белка АПФ2 слизистой оболочки верхних дыхательных путей.

Иными словами, показан высокий уровень экспрессии АПФ2 в соскобах со слизистой оболочки языка до проведения сеанса ФДТ и полная нормализация уровня экспрессии АПФ2.

Таким образом, в результате проведенных *in vitro* экспериментальных исследований была установлена чрезвычайно высокая противовирусная активность ФДТ с метиленовым синим и радахлорином® в отношении SARS-CoV-2.

Гарантией безопасности использования этих фотосенсибилизаторов является их эффективность в концентрациях в 100-1000 раз меньших, чем указано в инструкциях по их медицинскому применению.

Комплексный патогенетический механизм действия ФДТ обусловлен, с одной стороны, обратимой инактивацией мембранного белка АПФ2, предотвращающей процесс фиксации вирусов и их транспорт в клетки, с другой – ингибированием репликации вируса в клетках, уже инфицированных SARS-CoV-2.

Кроме того, исследовательской группой из Лейпцигского университета обнаружено восстановление митохондриальной активности под воздействием ФДТ в клетках, инфицированных SARS-CoV-2 [Ziganshyna S. et al., 2022].

Есть основания полагать, что уникальный комплексный механизм ФДТ-инактивации позволит эффективно противостоять как исследованному коронавирусу SARS-CoV-2, так и новым штаммам мутирующего вируса.

Клиническая интерпретация полученных данных позволяет предположить, что применение низкодозной ФДТ способно предотвратить инфицирование эпителиальных клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей вирусом SARS-CoV-2 путем временной блокады «входных ворот» для вируса.

Фотодинамическая терапия может стать эффективным методом профилактики заражения новой коронавирусной инфекцией (COVID-

19), особенно в группах высокого риска, например, у медицинских работников, оказывающих медицинскую помощь данной категории больных, иммунокомпрометированных пациентов, лиц старше 60 лет и др.

2.3. Параметры лазерного излучения для экстракорпорального генерирования противовирусного фотодинамического эффекта

Ведущим путем передачи SARS-CoV-2 является воздушно-капельный, а входными воротами возбудителя – эпителий верхних дыхательных путей и эпителиоциты желудка и кишечника. Проведенные исследования *in vitro* позволили предположить, что ФДТ может стать эффективным методом инактивации вируса на ранней стадии заболевания на уровне верхних дыхательных путей, доступных для неинвазивного светового воздействия и экспериментально установить параметры лазерного излучения.

В случае дальнейшего развития заболевания при распространении вируса на нижние дыхательные пути и верхние отделы желудочно-кишечного тракта применение технологии фотодинамической инактивации также возможно с использованием эндоскопического оборудования, однако при этом существенно возрастает риск заражения медицинского персонала и инвазивность лечебной процедуры, а для ее осуществления требуется дополнительное высокотехнологичное оборудование, увеличение количества медицинских специалистов, что приведет к возрастанию стоимости процедуры и существенно ограничит ее применение в профилактических целях.

В связи с этим нами было изучена возможность выполнения экстракорпоральной ФДТ-инактивации вирусов в нижних дыхательных путях через кожные покровы с помощью сертифицированного медицинского оборудования и определены основные параметры лазерного и светодиодного излучения.

Проведенная патентная экспертиза не выявила в уровне техники сведений о том, что при аэрозольных ингаляциях с фотосенсибилизатором возможно осуществить ФДТ трахеи и бронхов через кожу над трахеей и над вырезкой рукоятки грудины, поэтому предложенный нами неинвазивный способ доставки световой энергии через кожные

покровы на сенсibilизированный респираторный эпителий трахеи и крупных бронхов с целью фотодинамической инактивации вируса представляет собой новизну и является оригинальным [Патент Российской Федерации № 2777462 от 18.12.2020].

Экспериментальные исследования были проведены в рамках Проекта НИР «Развитие на физическом факультете Новосибирского национального исследовательского государственного университета перспективной тематики исследований и разработок в области эффективности фотодинамической инактивации SARS-CoV-2 *in vitro*». Данный раздел исследования проведён совместно с лабораторией лазерных медицинских технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт лазерной физики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск) с 22 по 29 апреля 2020 года.

Целью исследования явилось экспериментальное определение параметров электромагнитного излучения красного диапазона, достаточного для экстракорпорального генерирования противовирусного фотодинамического эффекта на слизистой оболочке трахеи и бронхов биологической модели при условии отсутствия фотодеструктивного воздействия на кожу.

В качестве электромагнитного генератора был использован лазерный медицинский аппарат Лахта Милон (Квалитек, Москва), генерирующий непрерывное монохромное излучение с длиной волны $\lambda_1 = 662$ нм и $\lambda_2 = 675$ нм.

Расчёт параметров электромагнитного излучения был проведен на биологических моделях, изготовленных из трахеобронхиальных комплексов животных, наиболее близких по анатомическому строению и размерам к человеческим. На бойне после ветеринарного контроля получали лёгкие от только что забитых свиней и баранов.

В лабораторных условиях изготавливали модель, представляющую собой фрагмент трахеи и лоскута кожи, лишённого жира и щетины. От трахеи отсекали цилиндрический фрагмент, содержащий 6 хрящевых колец, двумя разрезами рассекали фрагмент трахеи вдоль, формируя полуцилиндр, удобный для исследований светопропускания. На наружную поверхность полуцилиндра плотно фиксировали

слой кожного лоскута, формируя кожно-трахеальный препарат с толщиной стенки 0,5 см.

Измерение светопропускания биологической модели производили, подавая лазерное излучение на поверхность кожи через кварц-полимерный световод с прямым выходом излучения, диаметр сердцевины многомодового оптоволокна 600 мкм (числовая апертура – $NA = 0,22$, коэффициент пропускания не менее 80%), удерживая световой луч под углом 90 градусов к поверхности кожи на расстоянии, формирующем световое пятно диаметром 0,5 см.

К противоположной (внутренней) поверхности кожно-трахеального препарата устанавливали измеритель оптической мощности для регистрации конечной мощности излучения.

На основании полученных данных рассчитывали спектральный коэффициент пропускания T_λ :

$$T_\lambda = \frac{\Phi_\lambda}{\Phi_{\lambda 0}},$$

где $\Phi_{\lambda 0}$ – поток падающего на среду монохроматического излучения, Φ_λ – поток монохроматического излучения, прошедший через кожно-трахеальный препарат.

Изменяя значения мощности излучения, изучали светопропускающие свойства биологической модели (табл. 2).

Таким образом, при толщине стенки биологической модели 0,5 см, при строго перпендикулярно направленном луче и диаметре светового пятна 0,5 см светопропускание препарата составило 3,5-6,0% от исходной мощности лазерного излучения, что связано со значительным поглощением энергии и её существенным диффузным рассеянием в тканях.

Мощность лазерного излучения значительно снижается на внутренней стенке трахеи, но даже остаточной мощности в совокупности с диффузно рассеянным излучением, распространяющимся по светопроводящим хрящам трахеи, достаточно для генерирования противовирусного фотодинамического эффекта в респираторном эпителии нижних дыхательных путей.

Таблица 2

Параметры светопропускания биологической модели
[оригинальная таблица]

Мощность лазерного излучения, Вт	Средняя плотность мощности лазерного излучения Вт/см ²	Конечная мощность, Вт	Спектральный коэффициент пропускания, T_{λ} , %
0,5	2,6	0,02	4,0
		0,03	6,0
		0,03	6,0
1,0	5,1	0,06	6,0
		0,04	4,0
		0,05	5,0
2,0	10,2	0,07	3,5
		0,08	4,0
		0,09	4,5

На следующем этапе нами изучена возможность применения для экстракорпоральной фотодинамической инактивации матричных светодиодных излучателей. Для этого в качестве электромагнитного генератора был использован лазерный (светодиодный) медицинский аппарат серии ЛатусТ-Фара (Аткус, Санкт-Петербург), генерирующий монохромное излучение с длиной волны $\lambda = 665 \pm 10$ нм и разработанный специально для фотодинамической терапии.

Для расчёта средней плотности мощности лазерного излучения вся поверхность линзы излучателя была укрыта чёрной светонепроницаемой маской с оставленной в центре диафрагмой в виде квадрата площадью 1 см².

После включения излучателя на максимальную мощность (8 Вт) с помощью измерителя оптической мощности определили мощность исходящего из апертуры диафрагмы светового потока.

При плотном контакте фотоприемника с диафрагмой линзы излучателя средняя плотность мощности лазерного излучения составила $0,13 \pm 0,01$ Вт/см², по мере увеличения расстояния между фотоприемником и линзой излучателя за счёт отражения и рассеивания электромагнитного излучения плотность мощности лазерного излучения прогрессивно снижалась, достигнув на расстоянии 5 см от излучателя среднего значения $0,05 \pm 0,01$ Вт/см².

Опираясь на полученные данные, было проведено исследование светопропускания биологической модели, при котором генерирование электромагнитного излучения осуществляли светодиодным медицинским излучателем ЛатусТ-Фара (Аткус, Санкт-Петербург) в красном спектральном диапазоне излучения ($\lambda = 665 \pm 10$ нм). Измерение светопропускания препарата производили, подавая лазерное излучение на поверхность биологической модели со стороны кожи.

Толщина стенки биологической модели составила 0,5 см, световое пятно диаметром 1,0 см, средняя плотность мощности излучения 0,05 Вт/см² и 0,13 Вт/см². Со стороны трахеальной слизистой биологической модели для регистрации конечной мощности излучения установили фотоприёмник ФД-24К с токовой фоточувствительностью 0,47 мкА/лк. Высокая чувствительность детектора позволила осуществить регистрацию фотонов, проходивших через ткани биологической модели с учетом диффузного светорассеивания даже при плотности мощности излучения 0,05 Вт/см².

Полученные результаты позволили предположить, что технические характеристики серийно производимого низкоэнергетического лазерного (светодиодного) медицинского аппарата ЛатусТ-Фара (Аткус, Санкт-Петербург) достаточны для генерирования противовирусного фотодинамического эффекта в респираторном эпителии нижних дыхательных путей.

Проверка этой гипотезы на живых биологических моделях имеет свои технические и этические ограничения, поэтому в качестве доказательства возможности достижения фотодинамического эффекта в слизистой оболочке трахеи при экстракорпоральном электромагнитном воздействии нами был использован метод флуоресцентной диагностики процесса фотообесцвечивания (Photobleaching).

Фотообесцвечивание – фотохимическое разрушение флуорофора. Молекула фотосенсибилизатора в возбужденном состоянии может либо испустить фотон, либо вступить в фотохимическую реакцию, которая предотвратит ее возвращение в возбужденное состояние. Такие необратимые модификации ковалентных связей обусловлены переходом флуорофоров из синглетного состояния в триплетное. Квантовый выход синглетного кислорода в процессе фотодинамической реакции приводит к фотообесцвечиванию [Bonacin J.A. et al., 2009; Demchenko A.P.,

2020].

Количество циклов возбуждения для достижения полного обесцвечивания варьирует, позволяя судить как о самом факте фотобличинга фотосенсибилизатора, так и оценить скорость фотохимической реакции. Флуоресцентный мониторинг позволяет осуществлять неинвазивный контроль накопления и «выгорания» ФС [Гамаюнов С.В. с соавт., 2015].

Флуоресцентный мониторинг накопления фотосенсибилизаторов в органах и тканях нашел широкое применение в клинической онкологии для детекции границы удаляемых злокачественных опухолей, интраоперационного выявления не диагностированных мелких метастазов, например, для оценки степени выраженности диспластического процесса экзоцервикса при вирус-ассоциированной патологии шейки матки [Гамаюнов С.В. с соавт., 2015; Ярославцева-Исаева Е.В. с соавт., 2018; Celli J.P. et al., 2010; Tyrrell J., Campbell S.M., Curnow A., 2011; Gaál M. et al., 2012].

Наибольшую популярность приобрела флуоресцентная диагностика в синем свете, поскольку именно в синем спектральном диапазоне излучения ($\lambda = 460$ нм) энергия фотонов, поглощаемая молекулами фотосенсибилизаторов из группы хлорина, вызывая их возбуждение с последующим переизлучением на длине волны красного диапазона, что визуально воспринимается в виде красного свечения на синем фоне подаваемого излучения [Bonnett R., Martinez G., 2001; Qin Y.L. et al., 2007; Shakibaie F., Walsh L.J., 2016; Daneshmand S. et al., 2018].

При реализации фотодинамической терапии происходит постепенное фотообесцвечивание ФС, и на определённом этапе его обнаружение методом флуоресцентной диагностики в синем свете становится невозможным, поскольку ответной красной флюоресценции не возникает.

Именно этот феномен фотобличинга положен нами в основу эксперимента, при котором фотодинамический эффект реализован в фотосенсибилизированном эпителиальном слое слизистой оболочки трахеи посредством кожного светодиодного электромагнитного облучения («освечивания») трахеи.

Для определения возможности достижения фотодинамического

эффекта в слизистой оболочке трахеи при экстракорпоральном воздействии низкоэнергетическим лазером красного спектрального диапазона на биологической модели была проведена флуоресцентная диагностика процесса фотообесцвечивания 0,0035% раствора радахлорина®, нанесенного на слизистую оболочку трахеи при электромагнитном облучении, сгенерированном лазерным медицинским аппаратом ЛатусГ-Фара (Аткус, Санкт-Петербург).

В качестве модели для изучения фотообесцвечивания использовали трахею барана. На слизистую оболочку трахеи с помощью компрессорного ингалятора (небулайзера) Omron CompAir NE-C28 Plus (Omron Corp., Япония) в виде аэрозоли наносили 4 мл 0,0035% раствора радахлорина®.

Затем мембранозную часть трахеи продольно рассекали, края трахеальной трубки хирургическими зажимами разводили в стороны и проводили флуоресцентную диагностику процесса фотообесцвечивания радахлорина®.

Сначала производили качественную оценку фотообесцвечивания. Визуализация и фоторегистрация флуоресценции радахлорина® на слизистой оболочке биологической модели трахеи производили в синем спектре светодиодного фонаря ($\lambda = 406$ нм) в тёмном помещении. Наличие флуоресценции определяли по характерному красному свечению слизистой оболочки на синем фоне подаваемого излучения. Выполняли цифровую фотофиксацию изображений.

Количественную оценку интенсивности флуоресценции радахлорина® производили с помощью цифровой системы визуализации флуоресценции фотосенсибилизаторов «Флуовизор» (Аткус, Санкт-Петербург).

Прибор предназначен для визуального контроля накопления фотосенсибилизатора в тканях. Под воздействием излучения красного диапазона ($\lambda = 660 \pm 20$ нм) фотосенсибилизаторы, содержащие хлорин Е6, начинают флуоресцировать [Аникеева М. с соавт., 2014].

«Флуовизор» – цифровая система визуализации флуоресценции, состоящая из светодиодного осветителя, оптического блока с цифровой монохромной SVGA камерой (752×582 px), обеспечивающих фокусировку картины пространственного распределения флуоресценции ФС, интерференционного фильтра для предотвращения попадания

возбуждающего лазерного излучения в видеокамеру, а также специальной платы захвата и персонального компьютера со специализированным программным обеспечением (рис. 8).

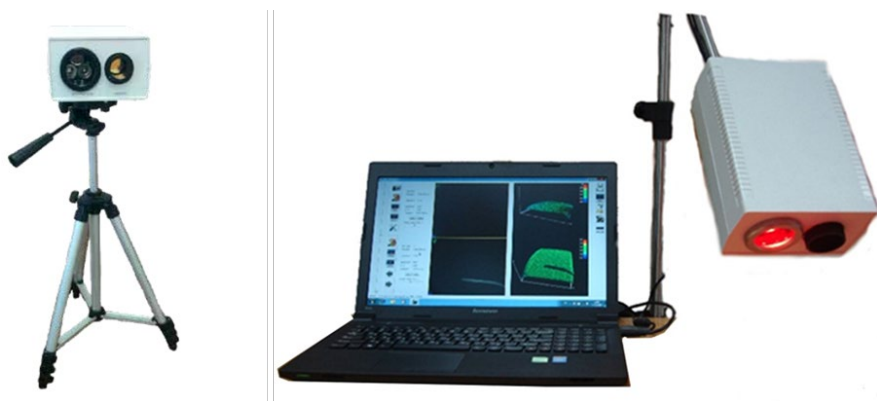


Рис. 8. Система для визуального контроля накопления фотосенсибилизатора «Флуовизор» (Аткус, Санкт-Петербург) [оригинальный рисунок].

Система визуализации «Флуовизор» позволяет проводить регистрацию и анализ пространственного распределения флюоресценции в режиме реального времени в диапазоне длин волн 670 ± 20 нм и на основе полученных оцифрованных данных охарактеризовать субстрат по интенсивности флюоресценции.

Флуоресцентный мониторинг фотодинамической терапии опухолей, например, позволяет оценить степень накопления препарата в опухоли, уточнить границы опухолевого поражения и контролировать выгорание ФС. На основании данных флуоресцентной диагностики может быть оптимизирован режим лазерного воздействия: время проведения процедуры после введения ФС, плотность мощности и доза лазерного облучения [Флуоресцентный мониторинг, 2015; Celli J.P. et al., 2010].

Сравнительную оценку интенсивности флюоресценции до и после ФДТ осуществляли по цифровым изображениям внутренней стенки трахеи на стоп-кадрах и трехмерных графиках в псевдоцвете. При этом значение цвета каждого пикселя соответствовало легенде

трехмерного графика таким образом, что наиболее яркие участки флуоресценции отображались красным цветом, а наиболее темные окрашивались в синий цвет.

После регистрации интенсивности флуоресценции фотосенсибилизированного слизистого слоя трахеи трахеальную трубку полностью окутывали выкроенным лоскутом из свиной кожи без жира толщиной 4-5 мм и проводили облучение биологической модели энергией медицинского матричного излучателя ЛатусТ-Маска (Аткус, Санкт-Петербург) (рис. 9).

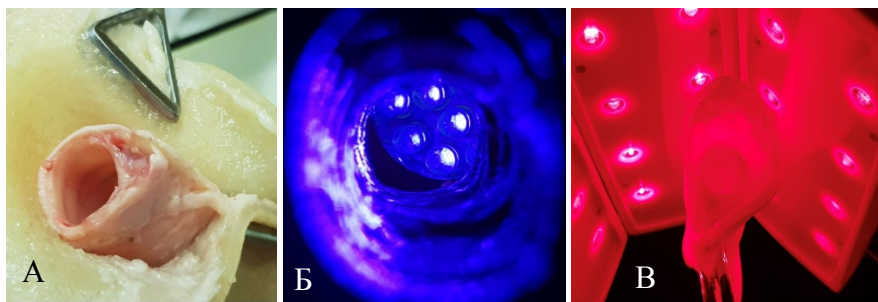


Рис. 9. Стадии облучения биологической модели [оригинальный рисунок]:

А – Формирование кожно-трахеального комплекса;

Б – слизистая оболочка трахеи после нанесения ФС радахлорин® в синем спектре освещения ($\lambda = 406 \text{ nm}$);

В – облучение кожно-трахеального комплекса на ЛатусТ-Маска (Аткус, Санкт-Петербург).

Параметры излучаемой энергии соответствовали красному диапазону в интервале длины волны $660 \pm 20 \text{ nm}$ при плотности мощности лазерного излучения 130 мВт/см^2 и продолжительности облучения 5 мин на расстоянии 5 см от биологической модели, что создавало на поверхности кожного лоскута среднюю плотность дозы излучения 39 Дж/см^2 .

После электромагнитного воздействия повторно выполняли оценку состоявшейся фотодинамической реакции на слизистой оболочке трахеи по регистрации фотообесцвечивания флуоресценции радахлорина® на слизистой оболочке трахеи.

Результаты исследования

В условиях темного помещения выполнена флуоресцентная диагностика в режиме, идентичном первоначальному и выявлено полное отсутствие ответной флуоресценции радахлорина® в синем спектре по всей поверхности слизистой оболочки трахеи, что свидетельствовало о состоявшейся полноценной фотодинамической реакции (рис. 10).

Визуально существенное снижение флуоресценции слизистой оболочки биологической модели трахеи свидетельствуют о том, что значительный объем нанесенного радахлорина® принял участие в фотохимической реакции, индуцированной лазерным облучением, что свидетельствует о принципиальной достижимости фотодинамического эффекта в слизистой оболочке трахеи при экстракорпоральном воздействии низкоэнергетическим лазером и светодиодным излучением красного спектрального диапазона.

Количественную регистрацию и анализ пространственного распределения флуоресценции радахлорина® произвели с помощью системы для визуального контроля накопления фотосенсибилизатора «Флуовизор» (Аткус, Санкт-Петербург) (рис. 11-13).

На рисунке 11 представлена псевдотрехмерная гистограмма распределения яркости флуоресценции радахлорина® на слизистой оболочке биологической модели трахеи до проведения ФДТ, отображенная рядом с реальной картиной, полученной с видеокамеры. При этом сама реальная картина представлена как в исходном виде в оттенках серого цвета, так и в псевдоцветах в соответствии с определенной принятой цветовой картой.

Для дополнительной наглядности результатов на полученных изображениях очерчены контуры постоянного значения яркости по определенному заданному уровню, которые представляют собой, фактически, границы нанесенного на слизистую оболочку фотосенсибилизатора. Флуоресцентная диагностика с помощью системы визуализации «Флуовизор» позволила документировать процесс фотообесцвечивания радахлорина® на слизистой оболочке биологической модели трахеи после проведения экстракорпоральной ФДТ низкоэнергетическим светодиодным лазером красного спектра (рис. 12-13).

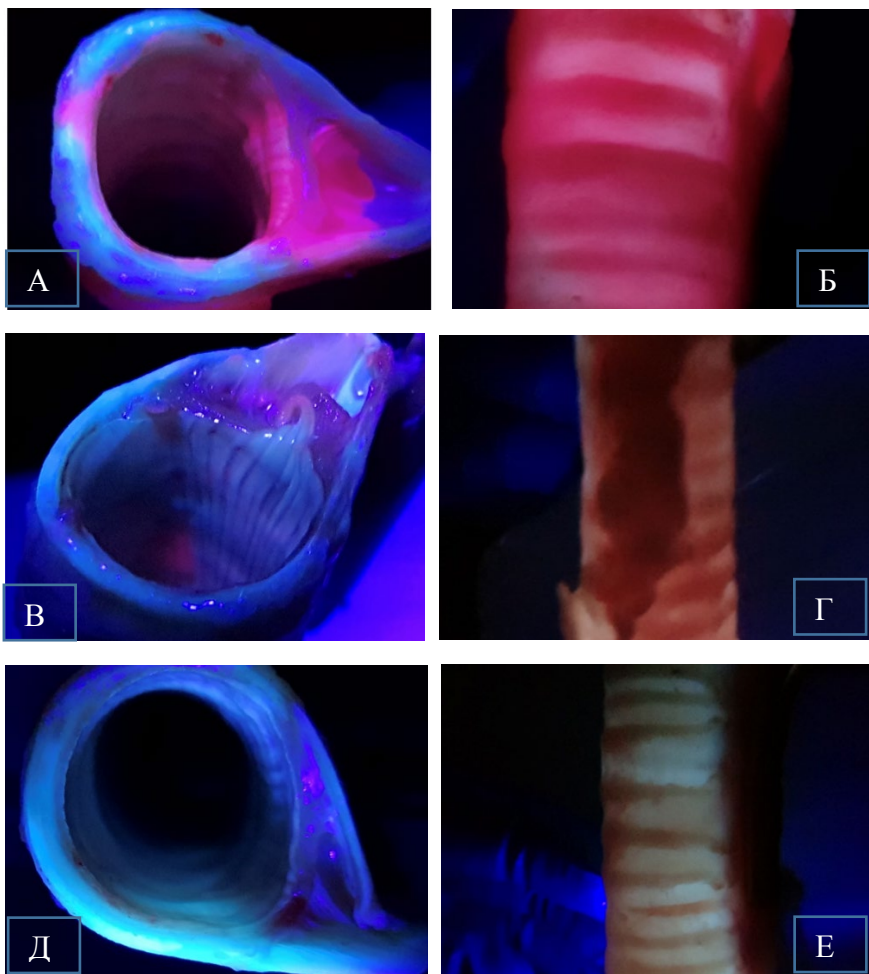


Рис. 10. Флуоресцентная диагностика фотобликинга радахлорина® вследствие светопропускания биологической модели трахеи. Диагностика в синем свете ($\lambda = 460$ нм) [оригинальный рисунок]:

А, Б – биологическая модель после нанесения радахлорина® до проведения ФДТ;

В, Г – после проведения ФДТ ($\lambda = 660 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения 130 мВт/см^2 , $T = 5$ мин, плотность дозы излучения 39 Дж/см^2);

Д, Е – после ФДТ ($\lambda = 660 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения 130 мВт/см^2 , $T = 5$ мин, плотность дозы излучения 78 Дж/см^2).

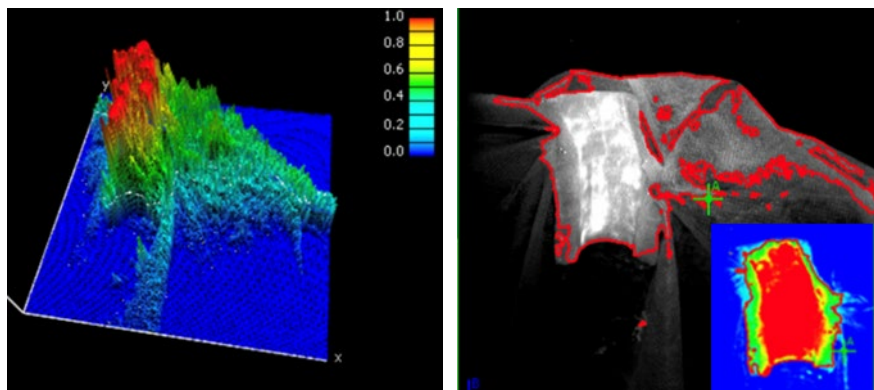


Рис. 11. Интенсивная флуоресценция радахлорина® на слизистой оболочке биологической модели трахеи в красном спектре излучения «Флуовизора» до проведения ФТД [оригинальный рисунок].

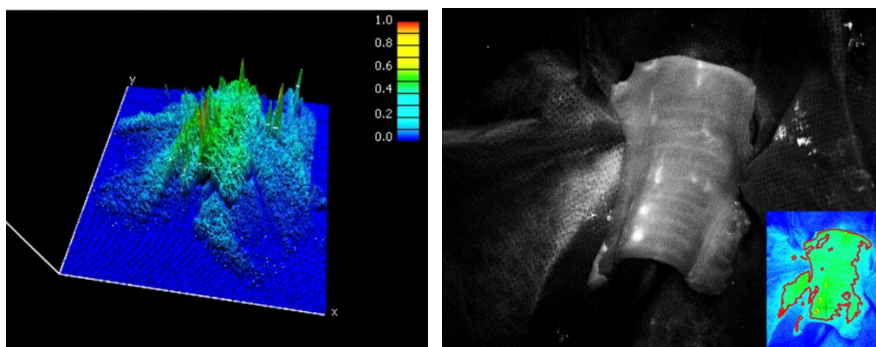


Рис. 12. Интенсивность флуоресценции радахлорина® на слизистой оболочке биологической модели трахеи в красном спектре излучения «Флуовизора» после ФТД ($\lambda = 660 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения 130 мВт/см^2 , $T = 5$ мин, плотность дозы излучения 39 Дж/см^2) [оригинальный рисунок].

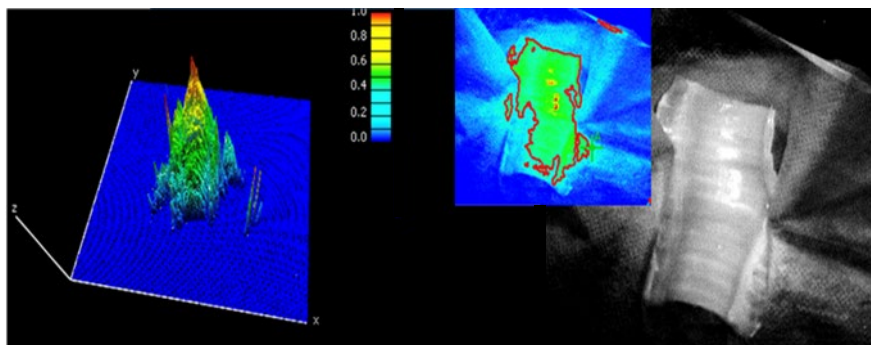


Рис. 13. Интенсивность флуоресценции радахлорина® на слизистой биологической модели трахеи в красном спектре излучения «Флуовизора» после ФТД ($\lambda = 660 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения 130 мВт/см^2 , $T = 5$ мин, плотность дозы излучения 78 Дж/см^2) [оригинальный рисунок].

Как видно на представленных рисунках цифровых фотоизображений слизистой оболочки биологической модели трахеи имевшаяся после моделирования ингаляции высокоинтенсивная флюоресценция радахлорина® после проведения экстракорпоральной ФДТ перестала определяться.

Исчезновение флуоресценции свидетельствует о фотохимическом разрушении флуорофора вследствие квантового выхода синглетного кислорода, так как именно активный кислород в процессе фотодинамической реакции, индуцированной низкодозовым лазерным и светодиодным облучением красного спектра, приводит к фотообесцвечиванию радахлорина®.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования убедительно показали эффективность фотодинамической инактивации в отношении возбудителя новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19). Установлен патогенетический механизм фотодинамической инактивации при использовании метиленового синего и радахлорина®, обусловленный, с одной стороны, обратимой инактивацией мембранного белка АПФ2, предотвращающей процесс фиксации вирусов и их транспорт внутрь клетки, с другой – ингибированием репликации вируса в клетках, уже инфицированных SARS-CoV-2.

Определены параметры электромагнитного излучения для экстракорпорального генерирования противовирусного фотодинамического эффекта на слизистой оболочке дыхательных путей.

Полученные результаты показали, что технические характеристики серийно производимого отечественного лазерного медицинского оборудования достаточны для генерирования противовирусного фотодинамического эффекта в респираторном эпителии дыхательных путей.

Запатентован новый способ профилактического лечения коронавирусной инфекции на основе фотодинамической инактивации вируса.

Положительные результаты экспериментальных исследований дали основание на проведение клинической апробации предложенного метода.

Глава 3.

Клиническая апробация технологии антиковидной фотодинамической терапии для профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19)

На основании полученных результатов экспериментальных исследований нами была сформулирована комплексная концепция применения фотодинамической инактивации SARS-CoV-2 с целью профилактики заболевания у лиц с высокой степенью риска инфицирования, этиотропного (противовирусного) лечения больных COVID-19 на ранних сроках заболевания без яркой манифестации клинических симптомов и с лёгким течением в дебюте, в том числе имеющим риск тяжелого течения заболевания, а также в рамках реабилитационных мероприятий в период реконвалесценции.

Концепция предусматривает предотвращение проникновения вирусов в клетки слизистой оболочки верхних дыхательных путей путём фотодинамической инактивации мембранного белка АПФ2 слизистой оболочки и нейтрализации еще не проникшего в клетки хозяина вируса посредством необратимого повреждения спайковых белков в вирусной «короне», капсидных белков оболочки и вирусной РНК. В отношении вирусов, уже проникших в клетки, фотодинамическое воздействие обеспечивает необратимое повреждение вирусных структур и прекращение вирусной репликации.

Для подтверждения концепции были определены следующие направления ее клинической апробации:

- фотодинамическая профилактика у медицинских работников, оказывающих медицинскую помощь больным новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в «красных зонах»;

- фотодинамическая терапия больных с легким и среднетяжелым течением заболевания, в том числе имеющим риск тяжелого течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19);

- фотодинамическое воздействие с целью реабилитации реконвалесцентов, выписанных из инфекционных отделений на амбулаторное

реабилитационно-восстановительное лечение (третий этап медицинской реабилитации).

3.1. Эффективность фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Клиническая апробация и оценка эффективности метода фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) у медицинских работников проведена в ООО «Клиника профессора Пасман» – клинической базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (15.04.2020-15.10.2020) и в клинике НИИ терапии и профилактической медицины – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (05.06.2020-05.08.2020).

В исследовании приняло участие 100 медицинских работников-добровольцев и 51 родственник медработников из групп высокого риска.

В течение 6 месяцев никто из включенных в исследование медицинских работников не заболел новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), при этом вирусное инфицирование без клинических проявлений было выявлено в 2% случаев методом ПЦР в мазках со слизистой оболочки носоглотки.

Следует отметить, что у 10% включенных в исследование медработников-добровольцев методом ИФА был обнаружен диагностически значимый, но невысокий, уровень IgG к SARS-CoV-2, что свидетельствовало о бессимптомно перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19) на фоне проводимой фотодинамической профилактики с формированием гуморального противовирусного иммунитета.

Комментируя данный факт, необходимо учесть, что SARS-CoV-2 – оболочечный вирус с одноцепочечной РНК, и его фотодинамическая инактивация реализуется преимущественно посредством поврежде-

ния капсидных структур. Сохранившаяся РНК фотоинaktivированных вирусов может быть обнаружена в мазках со слизистых оболочек дыхательных путей методом ПЦР. РНК, кодируя белки (антигены) SARS-CoV-2, инициирует формирование иммунного ответа, по сути условно напоминающего механизм действия РНК-вакцин [Бруякин С.Д., Макаревич Д.А., 2021; Chia P.Y. et al., 2020; Colaneri M. et al., 2020].

Подобный механизм противовирусной ФДТ был продемонстрирован в экспериментальном исследовании G.S. Turner, C. Kaplan (1965), показавших, что фотодинамическое воздействие на вирус коревой оспы с применением 0,001% раствора метиленового синего приводит к полной инаktivации вируса через 6 минут. Вирусы полностью утрачивали свою инфекционность, сохраняя при этом свои антигенные свойства.

Авторы предположили возможность использования фотодинамически инаktivированных вирусов для разработки эффективной противооспенной вакцины для кроликов.

Вполне вероятно, что данный механизм фотодинамической инаktivации вируса объясняет полученные нами результаты исследования в части выявления вирусной РНК SARS-CoV-2 в 2% случаев и в факте спонтанного появления низких титров IgG SARS-CoV-2 в 10% случаев проведения профилактической антиковидной ФДТ среди лиц без клинических признаков COVID-19.

С учетом данных о низком уровне титра IgG к SARS-CoV-2, выявленном среди принявших участие в исследовании добровольцев, можно предположить, что исходная вирусная нагрузка в верхних дыхательных путях являлась незначительной и была успешно подавлена процедурами ФДТ, при этом количественное содержание антигенов возбудителя оказалось недостаточным для наработки высоких титров антител.

Среди родственников медицинских работников (n = 51), добровольно принявших участие в исследовании, группа имеющих высокий риск развития тяжелой инфекции, вызванной COVID-19, составила 78,4% [пожилой возраст ≥ 60 лет; сердечно-сосудистое заболевание, включая артериальную гипертензию; хроническое заболевание лег-

ких, включая бронхиальную астму; хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ); сахарный диабет 1 или 2 типа; хроническое заболевание почек; ожирение 2-3 степени].

В период проведения исследования все испытуемые регистрировали наличие многочисленных однократных и многократных личных контактов с лицами из числа бессимптомных и уже заболевших COVID-19, но ещё не подтверждённых серологически. На протяжении исследования все добровольцы оставались здоровыми и были вакцинированы в течение 2021 года.

Следует отметить, что большинство из присутствующих сегодня на рынке вакцин против COVID-19 продемонстрировали значительную эффективность в предотвращении заражения вирусом SARS-CoV-2, что, однако не привело к прекращению пандемии. Несмотря на высокую эффективность представленных вакцин против штамма SARS-CoV-2 дикого типа, почти все они показали значительное снижение эффективности против новых вариантов SARS-CoV-2, которые демонстрируют более высокую контагиозность и улучшенную способность к уклонению от иммунного ответа.

Наибольшее снижение эффективности вакцин наблюдалось против вызывающих озабоченность, по определению ВОЗ, вариантов SARS-CoV-2, включая Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон [Bian L. et al., 2022].

В качестве примера эффективности профилактического лечения для предотвращения COVID-19 представляется случай многократных длительных контактов с несколькими заразными больными.

Клинический пример. Пациентка Ж., 75 лет.

Диагноз: Наблюдение по контакту с больными COVID-19. Сахарный диабет 2 тип инсулиннезависимый. Гипертоническая болезнь 2Б ст. Риск 3. Ожирение 3 ст.

Ежедневно принимает гипотензивные препараты под контролем АД, сахароснижающие препараты (глюкофаж), статины, соблюдает диету.

Эпиданамнез. В период пандемии новой коронавирусной инфекцией не болела. С января 2021 г. проходит профилактическое лечение COVID-19 орошением верхних дыхательных путей раствором метиленового синего 0,01%. Вакцинирована в июле и августе 2021 года дважды векторной вакциной Спутник для профилактики коронавирусной инфекции,

вызываемой вирусом SARS-CoV-2. Уровень антител не проверяла.

В период 12-16 октября 2021 г. оказалась в ежедневном контакте с двумя заразными больными COVID-19, проводя ежедневно процедуры профилактики заражения раствором метиленового синего 0,01% в виде полоскания горла и закапывания в нос с последующей фотодинамической терапией персональным светодиодным прибором «Фотоник-мини» два раза в день.

Обстоятельства эпидемического контакта. Пациентка Ж. имела подругу – пациентку М. в возрасте 70 лет, больную сахарным диабетом 2 типа, которая заболела 2 октября 2021 года острой респираторной инфекцией с нарастающей лихорадкой и слабостью. Пациентка М., ухаживая за больной беспомощной матерью в возрасте 88 лет (пациентка К.), не нашла возможности обратиться в поликлинику в дебюте заболевания и на 10-е сутки болезни поняла, что без посторонней помощи не сможет добраться до участковой поликлиники. Вызвала по телефону подругу – пациентку Ж. с просьбой сопроводить её в поликлинику для сдачи анализов и КТ лёгких.

С утра 12.10.2021 пациентка Ж. вступила в ежедневный многочасовой контакт с заболевшей М., сопровождала её в поликлинику для сдачи анализов крови, мазков из носа и зева, выполнения КТ лёгких. Обеспечила уход на дому за ослабевшей больной подругой и её беспомощной матерью (пациентка К.), которые в домашних условиях не соблюдали масочный режим. Ежедневно, возвращаясь домой из контакта, пациентка Ж. проводила профилактику метиленовым синим 0,01% трансназальными инстилляциями и полосканием горла. По данным КТ лёгких от 12.10.2021 у пациентки М. выявлена двухсторонняя интерстициальная пневмония (КТ – 60%), а 14.10.2021 получен результат мазка из носоглотки, в котором методом ПЦР выявлена РНК SARS-CoV-2.

Узнав в тот же день о том, что больная подруга М. является заразной, пациентка Ж. усилила профилактику инфицирования коронавирусом, обрабатывая верхние дыхательные пути метиленовым синим 0,01% 2 р./д. и принимая через рот метиленовый синий 0,01% по 100 мл × 2 р./д. В тот же день у пациентки М. поднялась температура до 39°C, сатурация снизилась до 76%, и она была госпитализирована в инфекционное отделение, где через сутки, 15.10.2021, умерла от коронавирусной пневмонии.

Пациентка Ж. продолжила ухаживать за оставшейся в одиночестве беспомощной пациенткой К. и 16.10.2021 обнаружила у неё высокую температуру тела и утрату сознания. Вызванная бригада скорой помощи увезла больную К. в инфекционную больницу, где она умерла в ближайшие сутки от осложнений новой коронавирусной инфекции и пневмонии, подтверждённых КТ лёгких и положительным мазком в ПЦР на РНК SARS-CoV-2.

Таким образом, пациентка Ж., в возрасте 74 года, с сахарным диабетом 2 типа и ожирением 3 ст., имеющая высокие риски заболевания тяжёлой формой коронавирусной инфекции, оказавшись в эпидемическом очаге в процессе ежедневного тесного контакта с больными COVID-19 на протяжении шести дней, выполняя мероприятия противовирусной профилактики заражения коронавирусом метиленовым синим, оказалась клинически бессимптомной в течение первой недели наблюдения.

Рекомендованы мазки из носоглотки на ПЦР РНК SARS-CoV-2, анализ крови на IgM и IgG к S-белку SARS-CoV-2, термометрия 3 р./сут., карантин в домашних условиях 2 недели. Назначены приём метиленового синего 0,01% – 100 мл внутрь ежедневно 2 р./д. и обработка верхних дыхательных путей метиленовым синим 0,01% с последующей ФДТ носоглотки 2 р./д. 14 дней при отсутствии клинических проявлений заболевания COVID-19. Данное назначение имело целью не только ежедневную инактивацию коронавируса в верхних дыхательных путях, но и ежесуточное распределение 20-ти миллиграммов метиленового синего по всем органам и системам для повсеместного подавления репликации вируса при его возможном распространении не только в лёгочной паренхиме.

При дальнейшем динамическом наблюдении за пациенткой Ж. её состояние и самочувствие оставались хорошими при стабильной нормотермии. Двукратно исследованные мазки из носоглотки методом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 в ближайшие дни после эпидконтактов оказались отрицательными, исследование IgM и IgG к S-белку SARS-CoV-2 не выявило антител, что указывает на отсутствие поствакцинального иммунитета и отсутствие следов перенесённого COVID-19. Сделан вывод о том, что заболевание не состоялось благодаря ежедневным лечебно-профилактическим процедурам антиковидной фотодинамической терапии на основе локального и системного противовирусного действия метиленового синего.

3.2. Эффективность фотодинамической терапии больных с легким и среднетяжелым течением заболевания новой коронавирусной инфекцией (COVID-19)

Клиническая апробация и оценка эффективности метода фотодинамической терапии больных с легким и среднетяжелым течением заболевания, в том числе имеющим риск тяжелого течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) проведена на 50 больных, которым в дебюте заболевания в амбулаторном режиме с помощью ингаляций, орошения носоглотки и приёма через рот метиленового синего в дозе

10 мг/сут обеспечено малосимптомное, лёгкое и среднетяжёлое течение заболевания с отсутствием дыхательной недостаточности в 92% случаев, прекращением лихорадки и восстановлением обоняния в течение 1-2 суток при отсутствии астении в 76,5% случаев, предотвращением вирусных пневмоний в 25% и КТ-признаках полной обратимости исходных вирусных поражений, составлявших исходно от 5 до 30% объёма лёгочной паренхимы.

3.3. Эффективность экстракорпоральной светодиодной фотодинамической терапии с целью реабилитации реконвалесцентов с выраженными остаточными изменениями в легких после перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Клиническая апробация и оценка эффективности метода экстракорпоральной светодиодной фотодинамической терапии с целью реабилитации проведена на 32 больных-реконвалесцентах, перенесших вирусные пневмонии средней и тяжелой степеней тяжести и направленных на стационарное и амбулаторное реабилитационно-восстановительное лечение (второй и третий этап медицинской реабилитации).

В течение двух недель им было проведено по 5 процедур ингаляций ФС радахлорин® с последующей экстракорпоральной ФДТ на фоне комплексного лечения в соответствии с актуальными Временными клиническими рекомендациями, что продемонстрировало быстрое противовоспалительное, дезинтоксикационное и рассасывающее действие с исчезновением одышки и субъективным восстановлением исходного уровня состояния здоровья (рис. 14).

Контрольную группу составили 28 пациентов (14 мужчин и 14 женщин), перенесших вирусные пневмонии средней и тяжелой степеней тяжести, имевшие схожие с основной группой остаточные изменения в легких и направленных на стационарное и амбулаторное реабилитационно-восстановительное лечение.

Все больные получили комплексное лечение в соответствии с актуальными Временными клиническими рекомендациями «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

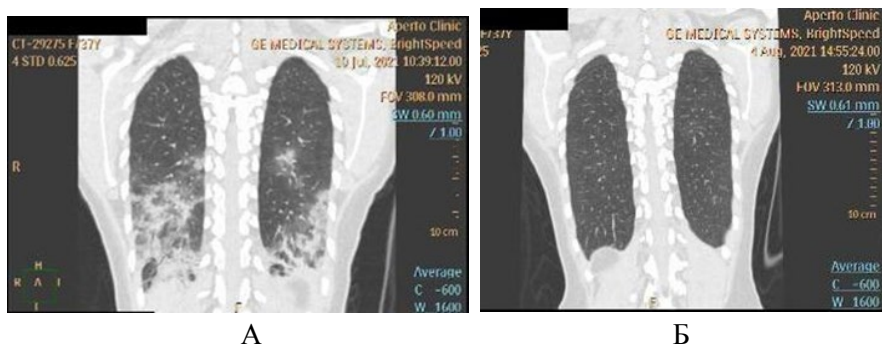


Рис. 14. Положительная динамика КТ легких на фоне терапии в виде разрешения зон консолидации с обеих сторон [оригинальный рисунок]:

А – КТ от 20.07.2021;

Б – КТ от 04.08.2021.

Оценку проводимого лечения осуществляли на основании контроля динамики изменений объема поражения легких по данным КТ до и после проведенного лечения (табл. 4).

До начала лечения группы достоверно не отличались по исходному объему поражения легких ($p > 0,05$).

При сопоставлении результатов КТ в контрольной и исследуемой группах спустя месяц после выписки из инфекционного отделения отмечали общие благоприятные тенденции разрешения патологических очагов в легких без статистически значимых отличий ($p > 0,05$).

Однако следует отметить, что в контрольной группе снижение показателя объема инфильтративно-воспалительных изменений лёгких происходило преимущественно за счет формирования пневмофиброза (78%) и усиления ретикулярных изменений (64%). Вместе с тем, в группе пациентов, получивших реабилитационную ФДТ лёгких, объем пневмофиброза через месяц был достоверно ниже и составил 29%.

Таблица 4.

Динамика изменений объема поражения легких по данным КТ до и после проведенного лечения [оригинальная таблица]

Параметры оценки	Группа ФДТ (n=32)	Контрольная группа (n=28)	P
Исходный объем поражения легких, %	42,7 ± 23,7	35,1 ± 22,6	0,67
Объем поражения легких через месяц, %	12,5 ± 9,8	18,7+17,7	0,44
Разница результатов через месяц, %	29,8 ± 16,1	16,9 ± 9,93	0,06
Доля пациентов с участками «матового стекла» на МСКТ спустя месяц, %	42%	57%	0,293
Доля пациентов с ретикулярными изменениями на МСКТ через месяц, %	43%	64%	0,074
Доля пациентов с участками фиброза на МСКТ спустя месяц, %	29%	78%	<0,01

Таким образом, несмотря на отсутствие статистически достоверных различий по общему объему остаточных постковидных КТ-изменений в обеих группах при изучении их структуры отмечена отчетливая положительная тенденция к более полной редукции воспалительных изменений у больных в исследуемой группе в случае включения в комплексное лечение ФДТ. Важно, что при этом в 2,7 раза меньше отмечался объем развития фиброза легочной ткани ($p < 0,01$).

3.4. Возможности повышения эффективности фотодинамической инактивации SARS-CoV-2

В ходе разработки методики фотодинамической инактивации вируса с использованием небулайзера возникла гипотеза о возможности преактивации фотосенсибилизатора непосредственно в аэрозольном потоке.

Совместно с лабораторией оптики биомолекул и кластеров (рук.

О.С. Васютинский) Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук были проведены стационарные и временные эксперименты, направленные на выявление фотофизических основ процессов фотодинамической инактивации вируса в верхних дыхательных путях путем распыления раствора фотосенсибилизатора.

В результате было выявлено, что в аэрозольной струе фотосенсибилизатора можно эффективно генерировать синглетный кислород, в том числе увеличивать его количество за счет повышения концентрации кислорода [Zhikhoreva A.A. et al., 2022].

Показано, что место осаждения ФС зависит от размера капель и их начальной скорости. Размер капель в небулайзере можно регулировать диаметром используемого сопла, который влияет на скорость потока. При большом размере сопла скорость аэрозольного потока ниже, а капли крупнее, их осаждение происходит преимущественно в ротоглотке (рис. 15).

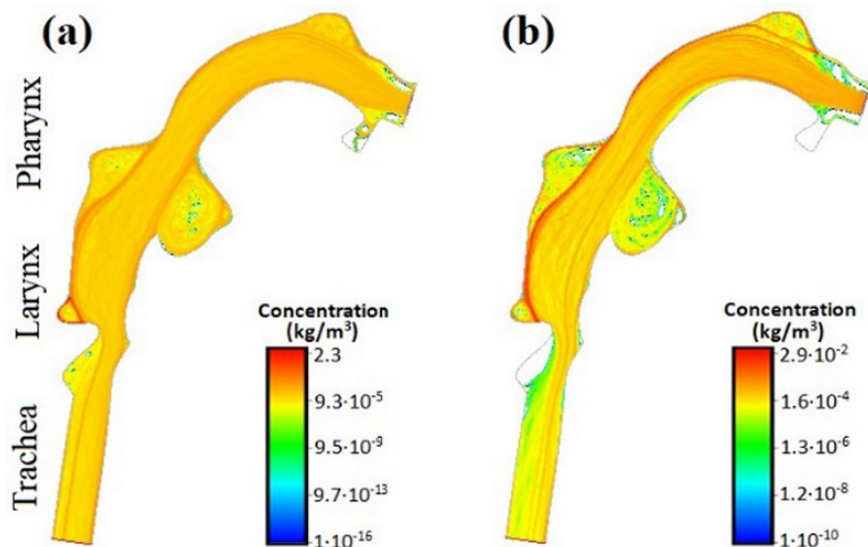


Рис. 15. Количественное моделирование распределения аэрозоля в верхних дыхательных путях при заданных условиях эксперимента и размерах капель 10 мкм (а) и 20 мкм (б) [оригинальный рисунок].

Для ингаляции нижних дыхательных путей необходимы капли размером 3-5 мкм [Kassab G. et al., 2019, 2020], что определяется техническими характеристиками небулайзера, при этом для ингаляции целесообразно использовать загубник.

Проведенные исследования легли в основу разработанных методов фотодинамической терапии для профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).

Глава 4.

Технология фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Фотодинамическая профилактика показана медицинским работникам, оказывающим медицинскую помощь больным новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в «красных зонах», здоровым лицам, имевшим контакт с больными и бессимптомными вирусоносителями, лицам с доказанным выделением SARS-CoV-2 без клинических симптомов заболевания (вторичная профилактика), а также лицам, имеющим противопоказания к вакцинации от коронавирусной инфекции.

4.1. Противопоказания к фотодинамической профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Противопоказаниями к фотодинамической профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19) являются повышенная кожная фоточувствительность, хронические заболевания печени, почек, сердечно-сосудистой системы в стадии декомпенсации, бронхиальная астма любой степени тяжести в стадии обострения, аллергия на метиленовый синий, радахлорин® (редко), гиперпродукция серотонина, беременность, детский возраст.

4.2. Материально-техническое оснащение метода фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

К материально-техническому оснащению метода фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) относится лазерно-светодиодный комплект оборудования и лекарственных фотосенсибилизаторов, представленный на рисунке 16.

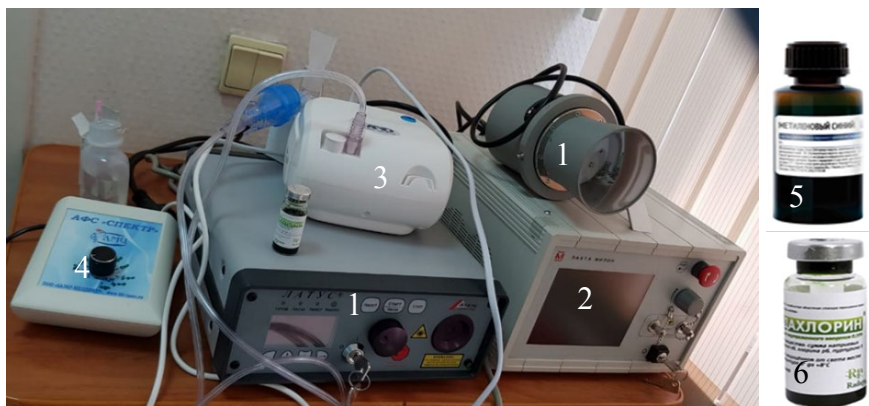


Рис. 16. Варианты оборудования для проведения фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) [оригинальный рисунок]:

- 1 – аппарат светодиодный медицинский ЛАТУС-Т Фара;
- 2 – аппарат лазерный медицинский Лахта-Милон;
- 3 – небулайзер Omron;
- 4 – аппарат фототерапевтический светодиодный (АФС) «Спектр»;
- 5 – ФС метиленовый синий 1% р-р 25 мл;
- 6 – ФС радахлорин® 0,35% р-р 10 мл.

4.3. Методика проведения фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Методика фотодинамической профилактики предполагает две ежедневные процедуры, первая из которых выполняется за 15-30 мин до входа на территории с повышенным эпидемиологическим риском инфицирования респираторной вирусной инфекцией («красная зона»), вторая – после возвращения из зоны эпидемиологического неблагополучия, снятия средств индивидуальной защиты и санитарной обработки.

Применение средств индивидуальной защиты (респираторы, резиновые перчатки, защитные очки) при этом не отменяется. Сеансы фотодинамической профилактики проводятся на протяжении всего

периода сохраняющихся высоких показателей заболеваемости (выявляемости) в регионе.

Алгоритм 1

В одноразовом стакане готовят раствор для орошения слизистых оболочек путем разведения 0,1 мл 1,0% раствора метиленового синего или 0,2 мл 0,35% радахлорина® в 10,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида или в 10,0 мл дистиллированной воды. Подготовленным раствором фотосенсибилизатора орошают слизистые оболочки носа, закапывая или впрыскивая с помощью шприца 1,0 мл раствора в каждый носовой ход.

Затем оставшимся раствором ФС в течение 1,5-2 минут пациент осуществляет полоскание ротоглотки, помогая языком распределить раствор на слизистую оболочку щёк и твёрдого нёба. В ходе полоскания горла препарат можно глотать, или после полоскания допустимо сплюнуть препарат в раковину и смыть проточной водой (рис. 17).

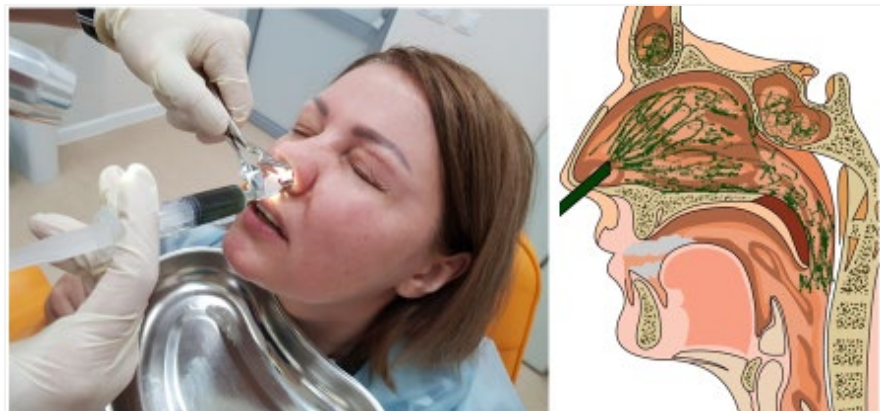


Рис. 17. Инстилляция радахлорина® в носовые ходы и ротоглотку обеспечивает распределение фотосенсибилизатора на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, лобной, основной и гайморовых пазух, задней стенки глотки [оригинальный рисунок].

После выполнения фотосенсибилизации слизистых оболочек осу-

ществляют сеанс фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) путем подачи световой энергии видимого красного диапазона. Облучение проводится дистанционным полипозиционным способом через преддверие носа и открытый рот путем формирования на слизистых оболочках световых пятен диаметром 2-4 см.

Параметры излучения: длина волны $\lambda = 660 \pm 20$ нм, выходная мощность электромагнитного генератора 0,5-1,0 Вт, плотность мощности излучения 0,01-0,3 Вт/см², плотность дозы излучения 4-15 Дж/см².

Излучатель располагают перед открытым ртом на расстоянии 2 см от губ, время экспозиции 5 мин, затем световой луч направляют через преддверие носа по направлению носовых ходов. Экспозиция – по 2 мин с каждой стороны (рис. 18).

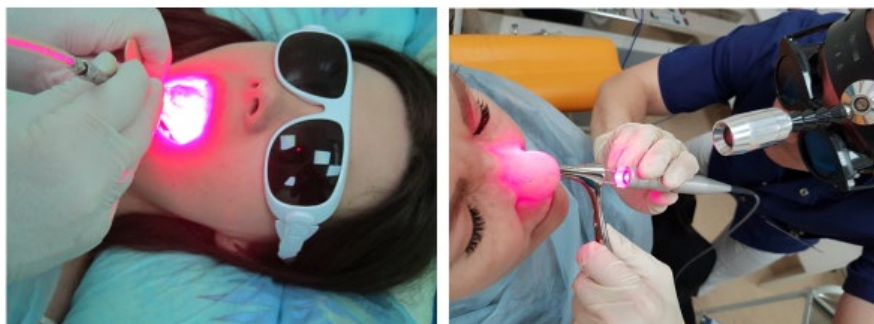


Рис. 18. Неинвазивная трансназальная и трансоральная антиковидная лазерная фотодинамическая терапия для профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции [оригинальный рисунок].

Светодиодное излучение не представляет опасности для здоровья и органов зрения, но смотреть на яркий свет противопоказано ввиду перевозбуждения фоторецепторов сетчатки глаза. Специальная защита глаз не требуется.

Алгоритм 2. Доставка фотосенсибилизатора в дыхательные пути производится путём ингаляции через небулайзер с преактивацией его лазерным излучением.

С учетом результатов исследования коллектива под руководством О.С. Васютинского перспективным способом повышения эффективности фотодинамической инактивации является регулируемое повышение генерации синглетного кислорода непосредственно в аэрозольном потоке фотосенсибилизатора. Лазерная преактивация фотосенсибилизатора позволяет произвести фотодинамическое воздействие не только на полость рта и носа, но и на слизистую оболочку верхних и нижних дыхательных путей без дополнительного трансстрахеального фотовоздействия.

Формирование аэрозольного потока фотосенсибилизатора осуществляют с помощью компрессорного ингалятора (небулайзер) (рис. 19).



Рис. 19. Компрессорный ингалятор (небулайзер) Omron NE-C801 (Omron Corp., Япония) с блоком лазерной преактивации фотосенсибилизатора [оригинальный рисунок].

Раствор для фотодинамической профилактики готовят путем разведения 1,0 мл 1,0 % раствора метиленового синего или 2,0 мл 0,35% радахлорина® в 100,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида и помещают в емкость камеры небулайзера 4,5 мл.

Во время ингаляции аэрозольный поток раствора фотосенсибилизатора активируется лазерным или светодиодным излучением, подаваемым в направлении полупрозрачной трубки загубника на расстоянии 2-3 см от его наружной стенки.

Параметры излучения: длина волны $\lambda = 660 \pm 20$ нм, выходная мощность светового потока 0,5-1,0 Вт, плотность мощности излучения 0,01-0,3 Вт/см², плотность дозы излучения 4-15 Дж/см², экспозиция – 5 мин (рис. 20).



Рис. 20. Подготовка к ингаляции аэрозоля фотосенсибилизатора с преактивацией лазерным излучением [оригинальный рисунок].

Для эффективного воздействия на слизистые ротоглотки, гортани

и трахеи на протяжении всей пятиминутной процедуры следует вдыхать аэрозоль через рот, задерживать дыхание после вдоха на 1-2 секунды и делать выдох через нос, в результате чего ультрадисперсный активированный фотосенсибилизатор оседает на всей поверхности слизистой оболочки дыхательных путей, включая отделы, недоступные для прямого подведения лазерной энергии (рис. 21).



Рис. 21. Вдыхание аэрозоля фотосенсибилизатора с преактивацией лазерным излучением для воздействия на слизистую оболочку дыхательных путей [оригинальный рисунок].

Поглощение молекулами фотосенсибилизатора квантов света в присутствии кислорода приводит к фотохимической реакции, в результате которой триплетная форма молекулярного кислорода в аэрозольном облаке превращается в синглетную форму.

Субъективно пациентами это ощущается как поток мягкого тепла

и воспринимается рецепторами слизистой оболочкой полости рта как ощущение лёгкого першения, а в слизистой оболочке носа реакция рецепторов может проявляться щекотанием и изредка чиханием.

Данные ощущения не сопровождаются дискомфортом и самостоятельно проходят в течение 30 мин после завершения процедуры.

4.4. Сочетанные лечебно-оздоровительные эффекты фотодинамической профилактики COVID-19

После проведенного курса фотодинамической профилактики не исключены сочетанные (содружественные) лечебно-оздоровительные эффекты, обусловленные известными клиническими эффектами местного фотодинамического воздействия, среди которых:

- антимикробная фотодинамическая санация хронических бактериальных и грибковых инфекций ЛОР-органов (хронические гайморит, аденоидит, тонзиллит, ларингит);
- ремиссия поллиноза, риносинусопатии с отказом от применения антиконгестантов;
- излечение лейкоплакии слизистой оболочки полости рта и языка;
- купирование стоматита и обострения пародонтита;
- фотоотбеливание зубов;
- фотоотбеливание пигментных пятен на коже лица и легкий лифтинг птоза щёк с разглаживанием морщин;
- фотоактивация эпифиза способствует стимуляции продукции серотонина, сопровождающейся повышением работоспособности и ремиссией депрессивных расстройств и др.

4.5. Критерии оценки эффективности фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19)

Критерии оценки эффективности фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19) следующие:

- отсутствие клинических проявлений заболевания COVID-19 в период профилактических процедур;

- отсутствие клинических проявлений COVID-19 после очевидного контакта с больными COVID-19;
- отрицательные результаты ПЦР-диагностики мазков на SARS-CoV-2 при очевидном контакте с больными COVID-19;
- выявление ранних и поздних антител к SARS-CoV-2 в тестах ИФА, как свидетельство бессимптомно перенесённой и самоизлеченной коронавирусной инфекции при отсутствии клинических проявлений заболевания и отрицательной ПЦР в мазках;
- отсутствие у невакцинированных от COVID-19 лиц ранних и поздних антител к SARS-CoV-2 в ИФА при отрицательной ПЦР в мазках и отсутствии клиники заболевания при очевидных контактах с лицами с доказанным заболеванием COVID-19;
- развитие быстропроходящей клиники ОРВИ в лёгкой форме при отрицательной ПЦР на SARS-CoV-2 при выявленных через 3-4 недели в тестах ИФА ранних и поздних антителах к SARS-CoV-2 в низких титрах.

Глава 5. Технология фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2

Фотодинамическая терапия показана в составе комплексного антиковидного лечения больным с легким и среднетяжелым течением пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, в том числе имеющим риск тяжелого течения новой коронавирусной инфекции COVID-19. Имеющийся опыт лечения больных с тяжелым течением пневмонии, находящимися на ИВЛ требует дальнейшего изучения.

Учитывая стремительное распространение вируса в дыхательных путях с последующей полиорганной инвазией проведение первой процедуры противовирусной фотосенсибилизации следует начать в предельно короткие сроки от начальных проявлений болезни и тотчас после исполнения диагностических мазков для выявления возбудителя методом ПЦР или иммунохроматографическим экспресс-тестом.

5.1. Противопоказания к фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2

Противопоказаниями к фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2, являются повышенная кожная фоточувствительность, хронические заболевания печени, почек, сердечно-сосудистой системы в стадии декомпенсации, бронхиальная астма любой степени тяжести в стадии обострения, аллергия на метиленовый синий, радахлорин® (редко), гиперпродукция серотонина, беременность, детский возраст, лечение антидепрессантами.

5.2. Методика проведения фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2

Методика проведения фотодинамической терапии пневмонии,

вызванной SARS-CoV-2, предусматривает локальную доставку лекарственных фотосенсибилизаторов на слизистые оболочки верхних и нижних дыхательных путей и системную фотосенсибилизацию.

Системная фотосенсибилизация организма достигается приёмом per os 10-20 мл 1% раствора метиленового синего, разведённого в 100 мл воды или внутривенным капельным введением 1-2 мл 0,35% раствора радахлорина®, разведенного в 100 мл 0,5% раствора хлорида натрия.

Локальная фотосенсибилизация верхних дыхательных путей достигается закапыванием в оба носовых хода метиленового синего 0,01% – 2 мл или радахлорина® 0,0035% – 2 мл и путем полоскания горла метиленовым синим 0,01% – 10 мл или радахлорином® 0,0035% – 10 мл в течение одной минуты.

При наличии небулайзера осуществляется 5-минутная ингаляция 4 мл метиленового синего 0,01% или радахлорина® 0,0035%. В зависимости от тяжести клинического течения заболевания ингаляции фотосенсибилизатора проводятся в положении больного сидя, лежа или в прон-позиции.

Следует отметить, что после введения в организм данных фотосенсибилизаторов начинают развиваться немедленные лечебные противовирусные эффекты с инактивацией спайкового белка и блокированием репликации коронавируса, но разрушения вирусной РНК без фотодинамического воздействия произойти не может.

При проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ) мы использовали ингаляцию ФС без преактивации с помощью небулайзера Aeroneb Pro (Aeroneb, Ирландия), который был включен в дыхательный контур аппарата ИВЛ. Методику приготовления раствора для ингаляции не изменяли.

Продолжительность ингаляции 5 мин.

У больных пневмонией с самостоятельным дыханием ингаляционный этап методики может быть усилен преактивацией фотосенсибилизатора лазерным излучением аналогично алгоритму 2 вышеописанной методики фотодинамической профилактики COVID-19.

Через 6 мин после завершения ингаляции при пневмонии легкой и средней тяжести в положении больного сидя проводится экстракорпоральное чрескожное полипозиционное облучение грудной клетки с

помощью матричного светодиодного излучателя ЛатусТ-Маска или ЛатусТ-Фара (Аткус, Санкт-Петербург).

Локализация зоны воздействия соответствует кожной проекции патологических изменений в легких по данным компьютерной томографии.

Параметры излучения ЛатусТ-Фара (Аткус, Санкт-Петербург): длина волны $\lambda = 660 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения 100-150 мВт/см², площадь засвечивания 100 см², время экспозиции 10 мин на каждое поле (рис. 22).



Рис. 22. Чрескожная ФДТ двух лёгочных полей матричным излучателем ЛатусТ-Фара и дистантное облучение лазером Латус (Аткус, Санкт-Петербург) [оригинальный рисунок].

Параметры излучения ЛатусТ-Маска (Аткус, Санкт-Петербург): длина волны $\lambda = 660 \pm 20$ нм, плотность мощности излучения 110-130 мВт/см², площадь засвечивания 500 см², время экспозиции 10 мин на каждое поле (рис. 23).

Суммарная продолжительность сеанса ФДТ при двухсторонней пневмонии составляет 40-60 мин.

Частота выполнения – 1-2 раза в сутки. Продолжительность лечения – 3-5 дней.

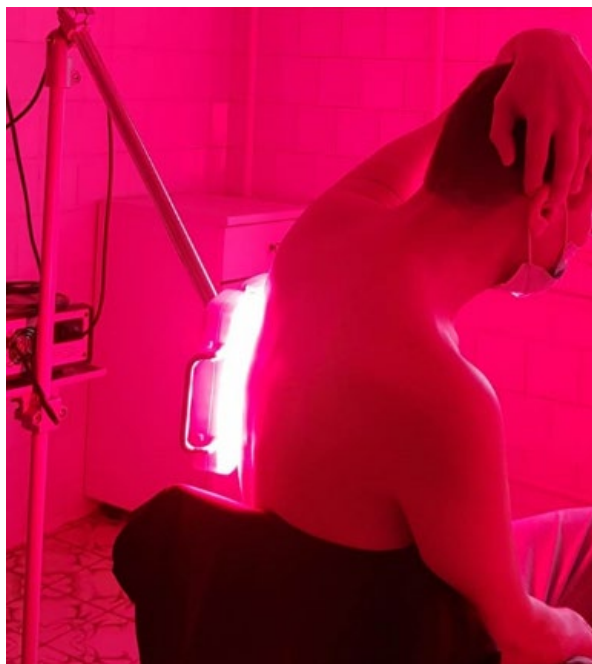


Рис. 23. Чрескожная фотодинамическая терапия лёгких матричным излучателем ЛатусТ-Маска (Аткус, Санкт-Петербург) [оригинальный рисунок].

Больным, находящимся на ИВЛ, необходимо увеличить содержание кислорода в воздушно-кислородной смеси, ориентируясь на показатели сатурации, при тех же параметрах объема и скорости подаваемого потока.

Продолжительность курса лечения 4-6 дней (рис. 24).

Контроль эффективности лечения проводится на основании комплексной оценки клинической картины, субъективных жалоб, показателей крови и сатурации кислорода, ПЦР- и ИФА-диагностики, а также динамики изменений компьютерной томографии органов грудной клетки и лабораторных маркеров системного воспалительного ответа (С-реактивный белок, прокальцитонин, ферритин, уровень и распределение лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов).



Рис. 24. Чрескожная фотодинамическая терапия лёгких матричным излучателем ЛатусТ-Маска (Аткус, Санкт-Петербург) в отделении интенсивной терапии у больного тяжелой пневмонией COVID-19, находящемся на инвазивной ИВЛ [оригинальный рисунок].

Необходимо отметить появление ложнонегативного симптома снижения сатурации на 2-3% вследствие насыщения крови фотосенсибилизатором, захватывающего световую энергию от фотоэлемента пульсоксиметра. Данный феномен полностью обратим в начальной фазе проведения ФДТ.

Представляем клинический пример успешного применения фотодинамической терапии в лечении пневмонии средней степени тяжести, вызванной SARS-CoV-2.

Клинический пример

Больной X., 55 лет, поступил в порядке неотложной помощи 04.10.2020, жалобы на одышку в покое, находится на масочной оксигенотерапии с 02.10.2020. Объективно: ПЦП SARS-CoV-2 – положительный от 26.09.2020, Т – 38,9°C, ЧДД – 26/мин, SpO₂ = 82%, ДН2Б, СРБ сыворотки крови 16 мг/л, КТ-4 (80%).

Диагноз:

Основное заболевание: Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован (U07.1).

Осложнения: Двусторонняя полисегментарная вирусная пневмония.

Лечение

Метиленовый синий 0,01% – 5 мл в ингаляции 1 раз в день 04.10.2020-29.10.2020. Метиленовый синий 0,01% – 100 мл per os 04.10.2020-29.10.2020. Чрескожная полипозиционная ФДТ на область заднебоковой поверхности грудной клетки после ингаляционной фотосенсибилизации 22.10.2020-29.10.2020 (рис. 25).

Больной выписан из инфекционного стационара в удовлетворительном состоянии 01.11.2020.

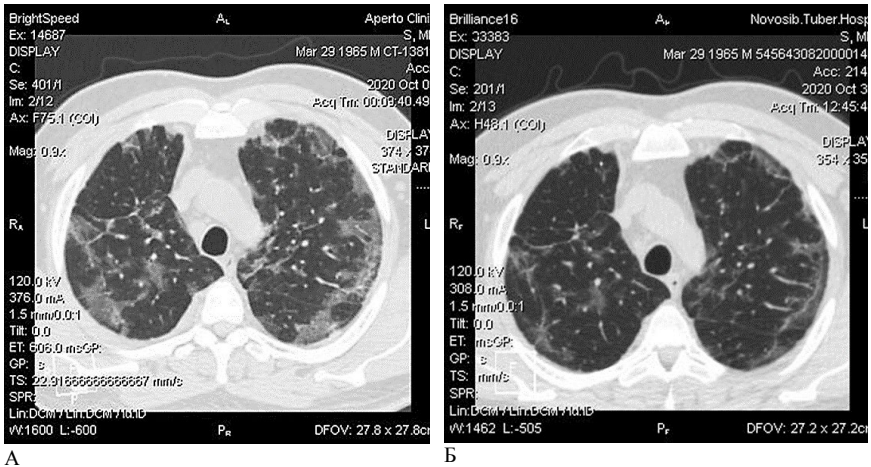


Рис. 25. Положительная динамика КТ легких на фоне терапии [оригинальный рисунок]:

А – КТ от 04.10.2020;

Б – КТ от 30.10.2020, SpO₂ = 99%, T – 36,9°C, показатели ФВД в норме.

Заключение

Концепция антиковидной фотодинамической терапии, разработанная на основе мультимодального применения фенотиазиновых и порфиринсодержащих лекарственных фотосенсибилизаторов, основанная на экспериментальных данных исследований *in vitro* и *in vivo* и подтверждённая пилотными клиническими исследованиями успешной профилактики заражения новой коронавирусной инфекцией и лечения COVID-19 в первой и второй фазах заболевания, убедительно демонстрирует этиопатогенетическую направленность сформированных неинвазивных стратегий локорегионального и системного воздействий, создающих основу для разработки новых методов фотовоздействия для профилактики и лечения острых респираторных вирусных инфекций и эпидемически значимого снижения заболеваемости и смертности от COVID-19.

Фотодинамическая терапия – безопасная, экономичная и простая в применении технология без очевидных побочных эффектов. Применение в качестве фотосенсибилизаторов метиленового синего и рихлорина® является специфичным для SARS-CoV-2 и вряд ли сможет вызвать его резистентность.

Механизмы вирусной фотоинактивации не ограничиваются SARS-CoV-2 и также могут представлять собой многообещающий инструмент для инактивации других, до сих пор неизвестных вирусов.

Проведённое исследование закладывает фундамент для дальнейших разработок новых методов профилактики и лечения респираторных инфекций и позволяет уменьшить потенциальные будущие проблемы, связанные с лекарственной устойчивостью возбудителей.

Постановление бюро секции медико-биологических наук отделения медицинских наук РАН от 23.11.2020

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ПОСТАНОВЛЕНИЕ БЮРО СЕКЦИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ОТДЕЛЕНИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК РАН

Протокол № 16

23 ноября 2020 года

Научный доклад: "Обоснование внедрения на государственном уровне технологии профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции методом фотодинамической терапии "

Докладчик: доктор медицинских наук, профессор Никонов Сергей Данилович

Заслушав и обсудив доклад д.м.н., профессора Никонова С.Д. «Обоснование внедрения государственном уровне технологии профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции методом фотодинамической терапии» Бюро Секции медико-биологических наук Отделения медицинских наук РАН постановляет:

1. Одобрить экспериментальные исследования, проводимые в области изучен мультимодальной инактивации SARS CoV2 порфириносодержащими лекарственными фотосенсибилизаторами и фотодинамической терапией на их основе.

2. Рекомендовать профессору Никонову С.Д. продолжить исследования и разработки: (а) изучению эффективности неинвазивной экстракорпоральной фотодинамической инактивации эпидемически опасных респираторных инфекций вирусной и бактериальной этиологии, (б) установлению иммуноопосредованных механизмов регуляции системного и местного воспаления при антимикробной и противовирусной фотодинамической терапии респираторных инфекций, (в) по разработке клинических протоколов профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции порфириносодержащими лекарственными фотосенсибилизаторами и фотодинамической терапией на их основе.

3. Рекомендовать группе разработчиков технологии профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции методом фотодинамической терапии обратиться Минздрав РФ просьбой рассмотреть в ускоренном порядке возможность проведения многоцентровых клинических испытаний профилактики и лечения COVID-19 лекарственными фотосенсибилизаторами метиленовым синим и хлорином Е6 и антиковидной фотодинамической терапией.

Руководитель Секции
медико-биологических наук
ОМедН РАН
академик РАН



А.М. Дыгай

Контрольные вопросы

1. Определение и общая характеристика фотодинамической терапии (ФДТ).
2. Физико-химические основы ФДТ.
3. История создания метода. Первый клинический опыт применения ФДТ.
4. Институт Финзена. Лечение туберкулезной волчанки.
5. Возможности фотодинамической инактивации микроорганизмов и вирусов.
6. Механизм антимикробного действия ФДТ.
7. Механизм противовирусного действия ФДТ.
8. Предпосылки к использованию фотодинамической терапии для лечения и профилактики новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).
9. Патогенез развития ОРДС при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2.
10. Фотодинамическая инактивация SARS-CoV-2 *in vitro*.
11. Культивирование вируса SARS-CoV-2 и ростовая среда.
12. Инактивация вирусной взвеси лазерным облучением.
13. Лазерное воздействие на клеточную культуру.
14. Ингибирование репликации вируса SARS-CoV-2.
15. Результаты применения фотодинамической терапии для лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).
16. Фотодинамическая терапия инфицированных SARS-CoV-2 клеточных культур.
17. Противовирусная активность фотосенсибилизаторов.
18. Патогенетические аспекты фотодинамической инактивации вируса SARS-CoV-2.
19. Параметры лазерного излучения для экстракорпорального генерирования противовирусного фотодинамического эффекта.
20. Эффективность фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19).
21. Эффективность фотодинамической терапии больных с легким и среднетяжелым течением заболевания новой коронавирусной

инфекции (COVID-19).

22. Эффективность экстракорпоральной светодиодной фотодинамической терапии с целью реабилитации реконвалесцентов с выраженными остаточными изменениями в легких после перенесенной новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

23. Экспериментальные исследования в основе методов фотодинамической терапии для профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).

24. Противопоказания к фотодинамической профилактике новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

25. Материально-техническое оснащение метода фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

26. Методика проведения фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

27. Синергидные лечебно-оздоровительные эффекты фотодинамической профилактики COVID-19.

28. Критерии оценки эффективности фотодинамической профилактики новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

29. Противопоказания к фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2.

30. Методика проведения фотодинамической терапии пневмонии, вызванной SARS-CoV-2.

Тестовые задания

Инструкция: выберите один или несколько правильных ответов

1. Фотодинамическая терапия – это:

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	метод локального лечения опухолей	
б	метод системного лечения опухолей	
в	метод лучевой терапии	
г	метод локального лечения опухолей с использованием фототоксического эффекта	+

2. Сколько компонентов необходимо для реализации фототоксического эффекта

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	1	
б	2	
в	3	+
г	4	

3. Какой из классов фотосенсибилизаторов используется в настоящее время наиболее часто

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	производные гематопорфирина	
б	производные хлоринов	+
в	фталоцианины	
г	бактериохлорины	+

4. Какова глубина проникновения лазерного излучения на длине волны 662 нм

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	0,5	
б	1,0	
в	3,0	+

5. Зависит ли накопление фотосенсибилизатора в опухоли от ее морфологического типа

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	да	
б	нет	+
в	зависит от степени злокачественности	
г	не зависит от степени злокачественности	

6. Какова максимальная терапевтическая широта фотосенсибилизаторов из группы хлоринов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	превышение в 2 раза	
б	превышение в 3 раза	
в	превышение в 4 раза	
г	превышение в 5 раз	
д	превышение в 6 раз	+

7. Синглетный кислород и место его образования

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	в межклеточной жидкости	
б	в органеллах клеток	
в	в месте накопления фотосенсибилизатора	+
г	в строме опухоли	

8. Длительность существования синглетного кислорода в тканях

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	сек	
б	мин	
в	часы	
г	нс	+

9. Способ увеличения образования синглетного кислорода в тканях при ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	увеличить дозу фотосенсибилизатора	
б	увеличить световой поток	
в	увеличить насыщение тканей кислородом	+
г	сдавить опухоль	

10. Особенность воздействия синглетного кислорода на опухолевую ткань

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	запускает реакции перекисного окисления липидов	
б	оказывает цитотоксическое действие на ядро клеток	
в	ингибирует тирозинкиназные рецепторы	
г	повреждает мембраны опухолевых клеток и эндотелий сосудов опухоли	+

11. Особенность воздействия синглетного кислорода на сосуды опухолевой ткани

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	вызывает спазм и сосудистый стаз	+
б	увеличивает проницаемость сосудов	
в	повреждает тромбоциты крови	
г	не влияет на состояние эндотелия	

12. Особенность индукции апоптоза при проведении ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	апоптоз - форма реакции клеток на фотоповреждение	+
б	апоптоз не развивается в ответ на фотоповреждение	
в	апоптоз не зависит от фотосенсибилизатора и света	
г	апоптоз не имеет характера прямого цитотоксического действия ФДТ	

13. Особенность воздействия ФДТ на гуморальный и клеточный иммунитет организма человека

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ФДТ не влияет на иммунитет	
б	ФДТ влияет только на клеточный иммунитет	
в	ФДТ стимулирует только выработку иммуноглобулинов	
г	ФДТ стимулирует, как клеточный, так и гуморальный иммунитет	+

14. Механизмы снижения активности опухолевого процесса под влиянием ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	прямое фотоповреждение опухолевых клеток	
б	индукция апоптоза и некроза	
в	стимуляция иммунной реакции	
г	все перечисленные факторы работают совместно	+

15. Воздействие ФДТ на циркулирующие опухолевые клетки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	фотосенсибилизатор в них не накапливается	
б	фотосенсибилизатор накапливается, но не повреждает	
в	фотосенсибилизатор накапливается и проявляет цитотоксическое действие при воздействии светом	+
г	фотосенсибилизатор повреждает циркулирующие клетки без освещения	

16. Механизм резорбции опухоли после воздействия ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	резорбция опухоли происходит за счет макрофагов	
б	резорбция опухоли происходит за счет нейтрофилов	
в	резорбция опухоли происходит за счет дендритных клеток	
г	резорбция опухоли происходит за счет нейтрофилов и макрофагов	+

17. Какие осложнения возможны при ФДТ полых органов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	аллергические реакции	
б	кардиотоксичность	
в	рубцовый стеноз	
г	перфорация	+

18. Какие осложнения возможны при превышении дозы света

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не зависят от дозы света	
б	глубокий некроз тканей	+
в	присоединение вторичной инфекции	
г	выраженный болевой синдром	

19. Какой расчет дозы света является оптимальным

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	исходя из литературных данных	
б	исходя из расчетов по формуле	
в	исходя из мощности лазера	
г	исходя из мощности лазера и плотности мощности в зоне засветки	+

20. Какой режим лазерного излучения является оптимальным для реализации фотодинамической эффекта

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	непрерывный	
б	импульсно-периодический	+
в	не имеет значения	

21. Как эффективнее проводить фотодинамическую терапию – большим полем и длительно или малыми полями

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не имеет значения	
б	большим полем и длительно	
в	малыми полями с большой плотностью мощности на поле засветки	+

22. Существует ли опасность кровотечения при ФДТ опухоли бронха

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	нет	+
б	да	

23. Роль свободных радикалов, образующихся в опухолевой ткани под воздействием ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	окисление мембран клеток и их органелл	+
б	воздействие на строму опухоли	
в	воздействие на цитокины	

24. Эффект фотобличинга при ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	обесцвечивание красителя	+
б	фотосенсибилизация тканей	
в	накопление красителя в клетках	

25. Продолжительность резорбции опухоли после воздействия ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	2 недели	
б	2 месяца	
в	4-6 недель	+

26. Целесообразно ли проведение повторных сеансов ФДТ. Показания к повторным сеансам

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	нет	
б	да, по показаниям	+
в	всегда	

27. Определение флуоресцентной диагностики новообразований поверхностных тканей

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не имеет значения перед ФДТ	
б	позволяет уточнить факт накопления фотосенсибилизатора и границы опухоли	+

28. Значение эндоскопической флуоресцентной диагностики

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не имеет значения перед ФДТ	
б	позволяет уточнить наличие и границы невидимой глазом опухоли	+
в	только по показаниям	

29. Изменение стадирования при флуоресцентной диагностике

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	возможно	+
б	никогда	
в	редко	

30. Роль флуоресцентной диагностики в дозиметрии при ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не влияет на дозу света	
б	позволяет определить выцветание фотосенсибилизатора	+
в	не влияет на дозу фотосенсибилизатора	

31. Флуоресцентная диагностика глиальных опухолей головного мозга

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не имеет смысла	
б	не требует введения фотосенсибилизатора	
в	позволяет определить показания к интраоперационной ФДТ	+

32. Роль флуоресцентной диагностики при ФДТ рака мочевого пузыря

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не проводится	
б	не имеет диагностической ценности	
в	позволяет определить множественность поражения слизистой оболочки, границы опухоли и радикальность ТУР	+

33. Интраоперационная флуоресцентная диагностика при лечении рака яичников

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не проводится	
б	не имеет диагностической ценности	
в	позволяет выявить невидимые при лапароскопии очаги опухоли	+

34. Длительность фототоксического эффекта при использовании ФС различных классов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	несколько часов	
б	от суток до недели	
в	от суток до 6 месяцев	+

35. Как сократить общее время лазерного облучения при проведении ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	увеличить плотность мощности	
б	увеличить время облучения	
в	разделить большое поле облучения на несколько маленьких	+

36. Какие лазеры предпочтительней при проведении ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	твердотельные	
б	полупроводниковые	+
в	на красителях	

37. Следует ли увеличивать плотность энергии при ФДТ пигментированных меланом

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	да	
б	нет	
в	только при сильно пигментированных опухолях	+

38. Факторы, влияющие на экспозицию лазерного излучения при ФДТ и количество процедур

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	размеры и глубина залегания опухоли	+
б	выбор фотосенсибилизатора	
в	выходная мощность лазера	

39. Особенности ФДТ злокачественных опухолей кожи и слизистых оболочек

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	особенностей нет	
б	доза света должна быть больше обычной	
в	доза света должна быть оптимальной во избежание образования рубцов	+

40. Особенности ФДТ у больных раком молочной железы

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	особенностей нет	
б	ФДТ зависит от размеров опухоли и стадии опухолевого процесса	+
в	ФДТ не влияет на отдаленные результаты лечения	

41. Особенности ФДТ у больных раком мочевого пузыря

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ФДТ не проводится из-за неэффективности	
б	ФДТ проводится вместе с флуоресцентной диагностикой	+
в	ФДТ проводится вместе с химиотерапией	

42. Какая выходная мощность лазера устанавливается при проведении ФДТ с цилиндрическим диффузором

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	3 Вт	
б	5 Вт	
в	не более 1,2 Вт	+

43. Что произойдет при превышении:

а) лечебной дозы фотосенсибилизатора; б) оптимальной дозы света

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	без последствий	
б	увеличение зоны некроза	+
в	повреждение здоровых тканей	

44. Проявление фототоксического эффекта фотосенсибилизаторов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	боли в суставах	
б	повышение температуры	
в	гиперемия кожи и светобоязнь	+

45. Флуоресцентная диагностика при операциях «second look»

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	не применяется	
б	помогает найти микрометастазы	+
в	малоэффективна	

46. Механизм антибактериального и противовирусного воздействия ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ФДТ не используется	
б	разрушение мембраны бактерий и вирусов	+
в	ФДТ мало эффективна	

47. Значение фагоцитоза в резорбции опухоли после воздействия ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	фагоциты не участвуют	
б	фагоциты утилизируют обломки и фрагменты опухолевых клеток и органелл	+

48. Механизмы снижения активности опухолевого процесса под влиянием ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	прямой цитотоксический эффект на все клоны опухолевых клеток	+
б	не влияет на активность опухолевого процесса	
в	влияет только на химиорезистентные клоны	

49. Механизм селективного накопления фотосенсибилизатора в опухолях

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	накапливается во всех типах биоткани	
б	накапливается только в железистой ткани	
в	избирательно накапливается в клетках и их оргanelлах, что называется амфифильность	+

50. Возможно ли повреждение здоровых участков головного мозга при интраоперационной ФДТ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	да	
б	нет	+
в	при нарушении методики проведения ФДТ	

Список литературы

1. Аникеева М., Софронов А., Дремов С., Тер-Мартirosян А. Цифровая система визуализации флюоресценции для фотодинамической терапии // Фотоника. – 2014. – Т. 48, № 6. – С. 62-69.
2. Бредихин Д.А., Никонов С.Д., Чередниченко А.Г., Петренко Т.И. Фотодинамическая инактивация *Mycobacterium tuberculosis* радахлорином *in vitro* // Туберкулез и болезни лёгких. – 2018. – Т. 96, № 1. – С. 5-10. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-1-5-10
3. Буйлин В.А., Ларюшин А.И., Никитина М.В. Светолазерная терапия: руководство для врачей / М.-Тверь: Триада, 2004. – 255 с.
4. Ванг К., Фёдорова О.С., Трамбл В.Р., Чухайовски Л. Конъюгат порфирина с псораленом – новый ДНК-лиганд // Биоорганическая химия. – 1999. – Т. 25, № 3. – С. 220-225.
5. Гамаюнов С.В. Гребенкина Е.В., Ермилина А.А., Каров В.А., König К., Корчагина К.С., Скребцова Р.Р., Терехов В.М., Терентьев И.Г., Турчин И.В., Шахова, Н.М. Флуоресцентный мониторинг фотодинамической терапии рака кожи в клинической практике // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 75-83.
6. Гельфонд М.Л. Фотодинамическая терапия в онкологии // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – №4. – С. 204-210.
7. Гельфонд М.Л., Рогачев М.В. Фотодинамическая терапия. Фундаментальные и практические аспекты: учебное пособие для обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2018. – 148 с.
8. Кирилюк И.А., Святченко В.А., Д.А. Морозов, Казачинская Е.И., Киселев Н.Н., Бакунова С.М., Войнов М.А., Локтев В.Б., Григорьев И.А. Цитотоксичность нитроксильных радикалов *in vitro* в отношении опухолевых и диплоидных клеток человека и оценка их противовирусной активности // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. – Т. 57, № 1-2. – С. 3-12.
9. Кочетков А.В., Москвин С.В., Митьковский В.Г., Александрова А.Н. Лазерная терапия в комплексном лечении и реабилитации больных COVID-19: учебно-методическое пособие. – М-Тверь: Триада, 2020. – 24 с.

10. Маркевич П.С., Алехнович А.В., Кисленко А.М., Есипов А.А. Применение ультрафиолетового излучения в современной медицине (Обзор литературы) // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2019. – Т. 21, № 3. – С. 30-36. doi: 10.17816/brmma20669.
11. Москвин С.В., Кочетков А.В., Асхадулин Е.В., Митьковский В.Г. Лазерная терапия при COVID-19: профилактика, лечение и реабилитация. – Москва-Тверь: Триада, 2021. – 136 с.
12. Москвин С.В. Основы лазерной терапии. – Москва-Тверь: Триада, 2016. – 895 с.
13. О внесении изменения в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих: Постановление Правительства Российской Федерации от 31 января 2020 года № 66.
14. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) / Временные методические рекомендации. Версия 16 (18.08.2022) [Электронный ресурс]. – Москва: Минздрав России, 2022. – Режим доступа: <https://www.zdrav.ru/files/2022/August/16-versiya-kovid.pdf>.
15. Способ профилактического лечения коронавирусной инфекции: пат. 2777462 Рос. Федерация: МПК А61N5/067, А61K31/409, А61K31/5415, А61P31/14 / С.Д. Никонов, М.И. Воевода, А.П. Майоров, Н.М. Пасман, М.Л. Гельфонд; заявитель и патентообладатель Новосибирский государственный университет, ООО «Клиника профессора Пасман». – № 2000131736/09; заявл. 18.12.2020; опубл. 20.08.2002, Бюл. № 23 – 3 с.: ил. https://fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet?DB=RUPAT&DocNumber=2777462&TypeFile=html.
16. Странадко Е.Ф., Кулешов И.Ю., Караханов Г.И. Фотодинамическое воздействие на патогенные микроорганизмы (Современное состояние проблемы антимикробной фотодинамической терапии) // Лазерная медицина. – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 52-56.
17. Тимербулатов Ш.В., Тимербулатов М.В., Гайнуллина Э.Н., Гафарова А.Р., Тимербулатов В.М. Медикаментозное лечение коронавирусной болезни COVID-19: существует ли доказательная база? // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2020. – № 6. – С. 90-97. <https://doi.org/10.17116/hirurgia202006190>.
18. Хикматуллаева А.С., Рахимов Р.А., Абдукадырова М.А.,

Эгамова И.Н., Ярмухамедова Н.А. Современное представление о коронавирусной инфекции // Вестник науки и образования. – 2020. – Т. 100, № 22-2. – С. 58-66.

19. Ярославцева-Исаева Е.В., Каплан М.А., Капинус В.Н., Спиценкова И.С., Сокол Н.И. Флуоресцентная диагностика злокачественных новообразований кожи с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда // *Biomedical Photonics*. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 13-20.

20. Ackroyd R., Keltly C., Brown N., Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy // *Photochemistry and photobiology*. – 2001. – Vol. 74, № 5. – P. 656-669.

21. Abe H., Wagner S. J. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivative or merocyanine 540 photosensitization // *Photochemistry and photobiology*. – 1995. – Vol. 61, № 4. – P. 402-409.

22. Abdel-Kader M.H. The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present / *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*. – 2016. – P. 1-21 DOI: 10.1039/9781782626824-00001.

23. Agata J., Ura N., Yoshida H., Shinsh, Y., Sasaki H., Hyakkoku M., Shimamoto K. Olmesartan is an angiotensin II receptor blocker with an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme // *Hypertension Research*. – 2006. – Vol. 29, № 11. – P. 865-874.

24. Algorri J.F., Ochoa M., Roldán-Varona P., Rodríguez-Cobo L., López-Higuera J.M. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 17. – art. 4447. doi: 10.3390/cancers13174447.

25. Almeida A., Cunha A., Faustino M.A.F., Tomé A.C., Neves P.M.S. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents // *Photodynamic inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications*. – 2011. – Vol. 11. – P. 83-160.

26. Almeida A. Photodynamic Therapy in the Inactivation of Microorganisms. // *Antibiotics (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 138. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040138>.

27. Almeida A., Faustino M.A.F., Neves P.M.S. Antimicrobial photodynamic therapy in the control of COVID-19 // *Antibiotics Basel (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, № 6. – P. E320. [10.3390/antibiotics9060320](https://doi.org/10.3390/antibiotics9060320).

28. Alpert J.S. The Jeremiah Metzger Lecture: Jeremiah Metzger

and the Era of Heliotherapy // *Trans Am Clin Climatol Assoc.* – 2015. – Vol. 126. – P. 219-226.

29. Amin R.M., Bhayana B., Hamblin M.R., Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies // *Lasers in surgery and medicine.* – 2016. – Vol. 48, № 5. – C. 562-568.

30. Antimicrobial resistance / Fact sheets [Electronic resource]. - WHO, 2022. – Access mode: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [(accessed on 31 Oct 2022)].

31. Arentz J., von der Heide H.J. Evaluation of methylene blue based photodynamic inactivation (PDI) against intracellular B-CoV and SARS-CoV2 viruses under different light sources in vitro as a basis for new local treatment strategies in the early phase of a Covid19 infection // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2022. – Vol. 37. – art. 102642.

32. Aroso R.T. Schaberle F.A., Arnaut L.G., Pereira M.M. Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases // *Photochemical & Photobiological Sciences.* – 2021. – Vol. 20, № 11. – P. 1497-1545.

33. Bachmann B., Knüver-Hopf J., Lambrecht B., Mohr H. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light // *Journal of medical virology.* – 1995. – Vol. 47, № 2. – P. 172-178.

34. Baptista M.S., Cadet J., Di Mascio P., Ghogare A.A., Greer A., Hamblin M.R., Yoshimura T.M. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways // *Photochemistry and photobiology.* – 2017. – Vol. 93, № 4. – P. 912-919.

35. Barth J. Johann Wilhelm Ritter (1776-1810) and the discovery of ultraviolet irradiation 185 years ago // *Der Hautarzt: Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete.* – 1987. – Vol. 38, № 5. – P. 301-303.

36. Bartolomeu M., Rocha S., Cunha Â., Neves P.M.S., Faustino M.A., Almeida A. Effect of photodynamic therapy on the virulence factors of *Staphylococcus aureus* // *Frontiers in Microbiology.* – 2016. – Vol. 7. – P. 267.

37. Blázquez E., Rodríguez C., Ródenas J., Navarro N., Rosell R., Pina-Pedrero S., Polo, J. UV-C irradiation is able to inactivate pathogens found in commercially collected porcine plasma as demonstrated by swine

bioassay // *Veterinary microbiology*. – 2019. – Vol. 239. – art. 108450.

38. Bolze A., Luo S., White S., Cirulli E.T., Wyman D., Dei Rossi A., Lee W. SARS-CoV-2 variant Delta rapidly displaced variant Alpha in the United States and led to higher viral loads // *Cell Reports Medicine*. – 2022. – Vol. 3, № 3. – P. 100564.

39. Bonacin J.A. Engelman F.M., Severino D., Toma H.E., Baptista M.S. Singlet oxygen quantum yields ($\phi\Delta$) in water using beetroot extract and an array of LEDs // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2009. – Vol. 20. – P. 31-36.

40. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy // *Tetrahedron*. – 2001. – Vol. 57, № 47. – P. 9513-9547.

41. Boulnois J.-L. Photophysical Processes in Recent Medical Laser Developments: A Review // *Lasers in Medical Science*. – 1986. – Vol. 1, № 1. – P.47-66. doi: 10.1007/BF02030737/.

42. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. «Sun worship». *Encyclopedia Britannica*, 7 Oct. 2022, <https://www.britannica.com/topic/sun-worship>. Accessed 25 October 2022.

43. Cagno V. Medaglia C., Cerny A., Cerny T., Zwygart A.C.A., Cerny E., Tapparel C. Methylene Blue has a potent antiviral activity against SARS-CoV-2 and H1N1 influenza virus in the absence of UV-activation in vitro // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1-8.

44. Casteel M.J., Jayaraj K., Gold A., Ball L. M., Sobsey M.D. Photoinactivation of Hepatitis A Virus by Synthetic Porphyrins // *Photochemistry and Photobiology*. – 2004. – Vol. 80, № 2. – P. 294-300.

45. Celli J.P., Spring B.Q., Rizvi I., Evans C.L., Samkoe K.S., Verma S. Hasan Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization // *Chemical reviews*. – 2010. – Vol. 110, № 5. – P. 2795-2838.

46. Chanas A.C., Johnson B.K., Simpson D.I. Antigenic relationships of alphaviruses by a simple micro-culture cross-neutralization method // *The Journal of general virology*. – 1976. – Vol. 32, № 2. – P. 295-300. doi:10.1099/0022-1317-32-2-295.

47. Chirico F., Nucera G., Magnavita N. COVID-19: protecting healthcare workers is a priority // *Infection Control & Hospital Epidemiology*. – 2020. – Vol. 41, № 9. – P. 1117-1117.

48. Cho N.J., Glenn J.S. Materials science approaches in the development of broad-spectrum antiviral therapies // *Nature Materials*. – 2020. – Vol. 19, № 8. – P. 813-816.

49. Cho S.Y., Han J.H., Jang Y.J., Kim S.K., Lee Y.A. Binding Properties of Various Cationic Porphyrins to DNA in the Molecular Crowding Condition Induced by Poly (ethylene glycol) // *ACS omega*. – 2020. – Vol. 5, № 18. – P. 10459-10465.

50. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. [Electronic resource]. – NIH, 2022. – Access mode online: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov> [(accessed on 16 Nov 2022)].

51. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13, № 9. – art. 1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.

52. Costa L., Tomé J.P., Neves M.G., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Faustino M.A., Almeida A. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT // *Antiviral research*. – 2011. – Vol. 91, № 3. – P. 278-282.

53. Costa L., Faustino M.A., Neves M.G., Cunha A., Almeida A. Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages // *Viruses*. – 2012. – Vol. 4, № 7. – P. 1034-1074. doi:10.3390/v4071034.

54. Costa L., Tomé J.P., Neves M.G., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Cunha A., Almeida A. Susceptibility of non-enveloped DNA-and RNA-type viruses to photodynamic inactivation // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2012. – Vol. 11, № 10. – P. 1520-1523.

55. Daneshmand S., Bazargani S.T., Bivalacqua T.J., Holzbeierlein J.M., Willard B., Taylor J.M. Konety Blue light cystoscopy for the diagnosis of bladder cancer: Results from the US prospective multicenter registry // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. – Elsevier, 2018. – Vol. 36, № 8. – P. 361. e1-361. e6.

56. Daniell H., Nair S. K., Esmaeili N., Wakade G., Shahid N., Ganesan P.K., Collman R.G. Debulking SARS-CoV-2 in saliva using angiotensin converting enzyme 2 in chewing gum to decrease oral virus transmission and infection // *Molecular Therapy*. – 2022. – Vol. 30, № 5. – P. 1966-1978.

57. Daniell H. Nair S.K., Esmaili N., Wakade G., Shahid N., Ganesan P.K., Collman R.G. Debulking SARS-CoV-2 in saliva using angiotensin converting enzyme 2 in chewing gum to decrease oral virus transmission and infection // *Molecular Therapy*. – 2022. – Vol. 30, № 5. – P. 1966-1978.

58. Demchenko A.P. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection // *Methods and Applications in Fluorescence*. – 2020. – Vol. 8, № 2. – art. 022001. DOI 10.1088/2050-6120/ab7365.

59. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2002. – Vol. 233. – P. 351-371.

60. Dias L.D., Blanco K.C., Bagnato V.S. COVID-19: beyond the virus. The use of photodynamic therapy for the treatment of infections in the respiratory tract // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2020. – № 31. – art. 101804. DOI 10.1016/j.pdpdt.2020.101804.

61. Drug Approvals and Databases [Electronic resource]. – FDA, 2022. – Access mode online: <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs/drug-approvals-and-databases> [(accessed on 16 Nov 2022)].

62. Eickmann M., Gravemann U., Handke W., Tolksdor F., Reichenberg S., Müller T.H., Seltsam A. Inactivation of three emerging viruses-severe acute respiratory syndrome coronavirus, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus and Nipah virus-in platelet concentrates by ultraviolet C light and in plasma by methylene blue plus visible light // *Vox sanguinis*. – 2020. – Vol. 115, № 3. – P. 146-151.

63. El-Hussein A., Manoto, S.L. Ombinda-Lemboumba S., Alrowaili Z.A., Mthunzi-Kufa P.A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. – 2021. – Vol. 21, № 2. – P. 149-161.

64. Enwemeka C.S., Bumah V.V., Masson-Meyers D.S. Light as a potential treatment for pandemic coronavirus infections: A perspective. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – Vol. 207. – art. 111891. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111891.

65. EudraPharm [Electronic resource]. – EMA, 2022. – Access

mode online: <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/eudrapharm> [(accessed on 16 Nov 2022)].

66. Fekrazad R. Photobiomodulation and antiviral photodynamic therapy as a possible novel approach in COVID-19 management // Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery. – 2020. – Vol. 38, № 5. – P. 255-257.

67. Fiel R.J. Porphyrin – Nucleic acid interactions: A review // Journal of Bio-molecular Structure and Dynamics. – 1989. – Vol. 6, № 6. – P. 1259-1274.

68. Fitzpatrick T.B., Pathak M.A. Part IV: basic considerations of the psoralens: historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins // Journal of Investigative Dermatology. – 1959. – Vol. 32, № 2. – P. 229-231.

69. Floyd R.A., Schneider Jr J.E., Dittmer D.P. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses // Antiviral research. – 2004. – Vol. 61, № 3. – P. 141-151.

70. Fotinos N., Convert M., Piffaretti J.C., Gurny R., Lange N. Effects on gram-negative and gram-positive bacteria mediated by 5-aminolevulinic Acid and 5-aminolevulinic acid derivatives // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52. – P. 1366-1373.

71. Gaál M., Kui R., Hunyadi Z., Kemény L., Gyulai R. Fluorescence diagnosis of non-melanoma skin cancer // Orvosi Hetilap. – 2012. – Vol. 153, № 34. – P. 1334-1340.

72. Grzybowski A., Sak J., Pawlikowski J. A brief report on the history of phototherapy. Clinics in dermatology. – 2016. – Vol. 34, № 5. – P. 532-537. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.05.002>.

73. Gualano M.R., Olivero E., Voglino G., Corezzi M., Rossello P. Knowledge, attitudes and beliefs towards compulsory vaccination: a systematic review // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2019. – Vol. 15, № 4. – P. 918-931.

74. Hamblin M.R., Huang Y. (ed.). Imaging in Photodynamic Therapy. – CRC Press, 2017.

75. Hanna R. Dalvi S., Sălăgean T., Bordea I.R., Benedicenti S. Phototherapy as a rational antioxidant treatment modality in COVID-19 management; new concept and strategic approach: critical review // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9, № 9. – art. 875.

76. Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections // *Journal of Clinical and Translational Research*. – 2015. – Vol. 1, № 3. – P. 140-167.

77. Hodgson S.H., Mansatta K., Mallett G., Harris V., Emary K.R., Pollard A.J. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2 // *The lancet infectious diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 2. – P. e26-e35.

78. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // *Cell*. – 2020. – Vol. 181, № 2. – P. 271-280. e8.

79. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *The lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10223. – P. 497-506.

80. Jin Y., Yang H., Ji W., Wu W., Chen S., Zhang W., Duan G. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19 // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 372.

81. Jin C., Yu B., Zhang J., Wu H., Zhou X., Yao H., ... & Wu N. Methylene blue photochemical treatment as a reliable SARS-CoV-2 plasma virus inactivation method for blood safety and convalescent plasma therapy for COVID-19 // *BMC Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 1-8.

82. Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppellotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications // *Lasers in surgery and medicine*. – 2006. – Vol. 38, № 5. – P. 468-481. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>.

83. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers // *Metal-based drugs*. – 2008. – art. 276109.

84. Judy M.M. Photodynamic inactivation of enveloped viruses: potential application for blood banking // *Journal of clinical laser medicine & surgery*. – 1990. – Vol. 8, № 4. – P. 49-52.

85. Kai H., Kai M. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors - lessons from available evidence and insights into COVID-19 // *Hypertension Research*. – 2020. – Vol. 43, № 7. – P. 648-654.

86. Kar B., Das U., Roy N., Paira P. Recent advances on organelle specific Ru (II)/Ir (III)/Re (I) based complexes for photodynamic therapy // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2023. – Vol. 474. – art. 214860.

87. Kashef N., Hamblin M.R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? // *Drug Resistance Updates*. – 2017. – Vol. 31. – P. 31-42.

88. Kassab G., Geralde M.C., Inada N.M., Achilles A.E., Guerra V.G., Bagnato V.S. Nebulization as a tool for photosensitizer delivery to the respiratory tract // *Journal of Biophotonics*. – 2019. – Vol. 12, № 4. – art. e201800189.

89. Kassab G., Cheburkanov V., Willis J., Moule M.G., Kurachi C., Yakovlev V., Bagnato V.S. Safety and delivery efficiency of a photodynamic treatment of the lungs using indocyanine green and extracorporeal near infrared illumination // *Journal of biophotonics*. – 2020. – Vol. 13, № 10. – art. e202000176.

90. Käsermann F., Kempf C. Photodynamic inactivation of enveloped viruses by buckminsterfullerene // *Antiviral research*. – 1997. – Vol. 34, № 1. – C. 65-70.

91. Kimberlin D.W., Whitley R.J. Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1996. – Vol. 37, № 3. – P. 403-421.

92. Kipshidze N., Yeo N., Kipshidze N. Photodynamic and sonodynamic therapy of acute hypoxemic respiratory failure in patients with COVID-19 // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2020. – Vol. 31. – art. 101961.

93. Kömerik N., Wilson M., Poole S. The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria // *Photochemistry and photobiology*. – 2000. – Vol. 72, № 5. – P. 676-680.

94. Lambrecht B., Mohr H., Knüver-Hopf J., Schmitt H. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light // *Vox sanguinis*. – 1991. – Vol. 60, № 4. P. 207-213. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1991.tb00907.x>.

95. Lauro F.M., Pretto P., Covolo L., Jori G., Bertoloni G. Photoactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2002. – Vol. 1, № 7. – P. 468-470.

96. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers // *Metal-based drugs*. – 2008. art. № 276109. <https://doi.org/10.1155/2008/276109>

97. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus // *Nature*. – 2003. – Vol. 426, № 6965. – P. 450-454.

98. Li Y., Tenchov R., Smoot J., Liu C., Watkins S. A Comprehensive Review of the Global Efforts on COVID-19 Vaccine Development // *ACS Central Science*. – 2021. – Vol. 7, № 4. – P. 512-533.

99. Liu Y., Qin R., Zaat S.A., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections // *Journal of Clinical and Translational Research*. – 2015. – Vol. 1, № 3. – P. 140.

100. Liu J., Zheng X., Tong Q., Li W., Wang B., Sutter K., Trilling M., Lu M., Dittmer U., Yang D. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. – *Journal of medical virology*. – 2020. – Vol. 92, № 5. – P. 491-494. – <https://doi.org/10.1002/jmv.25709>.

101. Lobo C.S., Rodrigues-Santos P., Pereira D., Núñez J., Trêpa J.C., Sousa D.L., Arnaut, L.G. Photodynamic disinfection of SARS-CoV-2 clinical samples using a methylene blue formulation // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2022. – P. 1-9.

102. Lotfi M., Hamblin M.R., Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities // *Clinica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 508. – P. 254-266. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.044>.

103. Lyon J.P., Moreira L.M., de Moraes P.C., dos Santos F.V., de Resende M.A. Photodynamic therapy for pathogenic fungi // *Mycoses*. – 2011. – Vol. 54, № 5. – P. 265-271. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01966.x>.

104. Lythgoe K.A., Hall M., Ferretti L., de Cesare M., MacIntyre-Cockett G., Trebes A., Golubchik SARS-CoV-2 within-host diversity and transmission // *Science*. – 2021. – Vol. 372. – № 6539. – P. eabg0821.

105. Macdonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2001. – Vol. 5, № 2. – P. 105-129.

106. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2009. – Vol. 9, № 8. – P. 974-983.

107. Maisch T., Hackbarth S., Regensburger J., Felgenträger A., Bäumlle W., Landthaler M., Röder B. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century // *Journal of the German Society of Dermatology*. – 2011. – Vol. 9, № 5. – P. 360-366. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387-2010.07577.x>.

108. Marciel L., Teles L., Moreira B., Pacheco M., Lourenco L.M., Neves M.G., Almeida A. An effective and potentially safe blood disinfection protocol using tetrapyrrolic photosensitizers // *Future Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 9, № 4. – P. 365-379.

109. Mariewskaya K.A., Tyurin A.P., Chistov A.A., Korshun V.A., Alferova V.A., Ustinov A.V. Photosensitizing antivirals // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 13. – art. 3971.

110. Mathieu E., Ritchie H., Rodés-Guirao L., Appel C., Giattino C., Hasell J., Macdonald B., Dattani S., Beltekian D., Ortiz-Ospina E., Roser M. Coronavirus Pandemic (COVID-19) [Electronic resource]. – Published online at [OurWorldInData.org](https://ourworldindata.org), 2020. – Access mode online: <https://ourworldindata.org/coronavirus>. [(accessed on 31 Oct 2022)].

111. De Matos B.T.L., Buchaim D.V., Pomini K.T., Barbalho S.M., Guiguer E.L., Reis C.H.B., Buchaim R.L. Photobiomodulation therapy as a possible new approach in COVID-19: A systematic review // *Life*. – 2021. – Vol. 11, № 6. – art. 580.

112. McCarthy J.R. et al. High-yielding syntheses of hydrophilic conjugatable chlorins and bacteriochlorins // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2009. – Vol. 7, № 17. – P. 3430-3436.

113. McDonagh A.F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium // *Journal of Perinatology*. – 2001. – Vol. 21, № 1. – P. 7-12.

114. Milgrom L.R. The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. – Oxford: Oxford University Press, 1997. – 249 p.

115. Mohr H., Lambrecht B., Selz A. Photodynamic virus inactivation of blood components // Immunological investigation. – 1995. – Vol. 24. – P. 73-83.

116. Müller-Breitkreutz K., Mohr H. Infection cycle of herpes viruses after photodynamic treatment with methylene blue and light // Beiträge zur Infusionstherapie und Transfusionsmedizin= Contributions to Infusion Therapy and Transfusion Medicine. – 1997. – Vol. 34. – P. 37-42.

117. Naci H., Kesselheim A.S., Røttingen J.A., Salanti G., Vandvik P.O., Cipriani A. Producing and using timely comparative evidence on drugs: lessons from clinical trials for covid-19 // British Medical Journal. – 2020. – Vol. 371.

118. Needham J. Science and civilisation in China. Chemistry and Chemical Technology. – Cambridge University Press, 1974. – Vol. 5. – art. 2510 p.

119. Nikolaeva-Glomb L., Mukova L., Nikolova N., Kussovski V., Doumanova L., Mantareva V., Galabov A.S. Photodynamic effect of some phthalocyanines on enveloped and naked viruses // Acta Virol. – 2017. – Vol. 61, № 3. – P. 341-346.

120. Nikš M., Otto M. Towards an optimized MTT assay // Journal of Immunological Methods – 1990. – Vol. 130, № 1. – P. 149-151. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90309](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90309).

121. Nordmann P., Poirel L., Toleman M.A., Walsh T.R. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2011. – Vol. 66, № 4. – P. 689-692.

122. O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy // Photochemistry and photobiology. – 2009. – Vol. 85, № 5. – P. 1053-1074.

123. O'Neil J. Review on Antibiotic resistance //Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Heal. Wealth Nations. – 2014. – P. 1-16.

124. Owada T., Yamada Y., Abe H., Hirayama J., Ikeda H., Sekiguchi S., Ikebuchi K. Elucidation of the HIV-1 virucidal mechanism of methylene blue photosensitization and the effect on primary isolates // *Journal of medical virology*. – 2000. – Vol. 62, № 4. – P. 421-425.

125. Oyim J., Omolo C.A., Amuhaya E.K. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy: Advancements in Porphyrin-Based Photosensitizer Development // *Frontiers in chemistry*. – 2021. – Vol. 9. – art. 635344. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.635344>.

126. Pérez-Laguna V., García-Malinis A.J., Aspiroz C., Rezusta A., Gilaberte Y. Antimicrobial effects of photodynamic therapy // *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale*. – 2018. – Vol. 153, № 6. – P. 833-846. <https://doi.org/10.23736/S0392-0488.18.06007-8>.

127. Pires L., Wilson B.C., Bremner R., Lang A., Larouche J., McDonald R., Whyne C. M. Translational feasibility and efficacy of nasal photodynamic disinfection of SARS-CoV-2 // *Scientific reports*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 1-10.

128. Pucelik B., Dąbrowski J.M. Photodynamic inactivation (PDI) as a promising alternative to current pharmaceuticals for the treatment of resistant microorganisms // *Advances in Inorganic Chemistry*. – 2022. – Vol. 79. – P. 65-103. doi: 10.1016/bs.adioch.2021.12.003.

129. Qin Y.L., Luan X.L., Bi L.J., Lü Z., Sheng Y.Q., Somesfalean G., Zhang Z.G. Real-time detection of dental calculus by blue-LED-induced fluorescence spectroscopy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2007. – Vol. 87, № 2. – P. 88-94.

130. Rahman M.M., Hasan M., Ahmed A. Potential detrimental role of soluble ACE2 in severe COVID-19 comorbid patients // *Reviews in Medical Virology*. – 2021. – Vol. 31, № 5. – P. 1-12.

131. Remuzzi A., Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10231. – P. 1225-1228.

132. Roelandts R. The history of phototherapy: something new under the sun? // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2002. – Vol. 46, № 6. – P. 926-930. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.121354>.

133. Sabino C.P., Ball A.R., Baptista M.S., Dai T., Hamblin M.R., Ribeiro M.S. Wainwright Light-based technologies for management of COVID-19 pandemic crisis // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – Vol. 212. – art. 111999.

134. Schagen F.H.E. Moor A.C.E., Cheong S.C., Cramer S.J., Van Ormondt H., Van der Eb A.J., Hoeben R.C. Photodynamic treatment of adenoviral vectors with visible light: an easy and convenient thod for viral inactivation // *Gene Therapy*. – 1999. – Vol. 6, № 5. – P. 873-881.

135. Shakibaie F., Walsh L.J. Violet and blue light-induced green fluorescence emissions from dental caries // *Australian dental journal*. – 2016. – Vol. 61, № 4. – P. 464-468.

136. Schikora D., Hepburn J., Plavin S.R. Reduction of the viral load by non-invasive photodynamic therapy in early stages of COVID-19 infection // *Am. J. Virol. Dis.* – 2020. – Vol. 2, № 1. – P. 01-05.

137. Shallcross L.J., Davies S. C. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2014. – Vol. 69, № 11. – P. 2883-2885. <https://doi.org/10.1093/jac/dku346>.

138. Shelton H.M. *Fasting and Sun Bathing*. – Bristol, UK: Mockingbird Press, 2019. – 396 p.

139. Shikowitz M.J., Abramson A.L., Freeman K., Steinberg B.M., Nouri M. Efficacy of DHE photodynamic therapy for respiratory papillomatosis: immediate and long-term results // *The Laryngoscope*. – 1998. – Vol. 108, № 7. – P. 962-967.

140. Sobotta L., Skupin-Mrugalska P., Mielcarek J., Goslinski T., Balzarini J. Photosensitizers mediated photodynamic inactivation against virus particles // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2015. – Vol. 15, № 6. – P. 503-521.

141. Sperandio F.F., Huang Y.Y., Hamblin M.R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria // *Recent Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 108-120. doi: 10.2174/1574891x113089990012.

142. Steinmann E., Gravemann U., Friesland M., Doerrbecker J., Müller T.H., Pietschmann T., Seltsam A. Two pathogen reduction technologies - methylene blue plus light and shortwave ultraviolet light-effectively inactivate hepatitis C virus in blood products // *Transfusion*. – 2013. – Vol. 53. – P. 1010-1018.

143. Sukumaran V., Veeraveedu P.T., Gurusamy N., Lakshmanan A.P., Yamaguchi K.I., Ma M., Watanabe K. Olmesartan attenuates the development of heart failure after experimental autoimmune myocarditis in

rats through the modulation of ANG 1-7 mas receptor //Molecular and cellular endocrinology. – 2012. – Vol. 351, № 2. – P. 208-219.

144. Svyatchenko V.A., Nikonov S.D., Mayorov A.P., Gelfond M.L., Loktev V.B. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2021. – Vol. 33. – art. 102-112.

145. Targosz-Korecka M., Kubisiak A., Kloska D., Kopacz A., Grochot-Przeczek A., Szymoski M. Endothelial glycocalyx shields the interaction of SARS-CoV-2 spike protein with ACE2 receptors // Scientific reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1-11.

146. Tan Y., Cheng Q., Yang H., Li H., Gong N., Liu D., Lei X. Effects of ALA-PDT on biofilm structure, virulence factor secretion, and QS in *Pseudomonas aeruginosa* // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2018. – Vol. 24. – P. 88-94.

147. Tardivo J. P., Wainwright M., Baptista M.S. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 118-121.

148. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2022. Thu. 27 Oct 2022. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1903/summary/>

149. Therapeutics and COVID-19: living guideline Ver. 16 September 2022.- [Electronic resource]. – WHO, 2022. – Access mode online: https://files.magicapp.org/guideline/fb1f95d-e2e9-4714-a054-1fb9a7374-f2c/published_guideline_6672-12_2.pdf. [(accessed on 1 Nov 2022)].

150. Transmission of SARS-CoV-2: Implications for Infection Prevention Precautions. [Electronic resource]. – WHO, 2022. – Access mode online: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions> [(accessed on 31 Oct 2022)].

151. Tyrrell J., Campbell S.M., Curnow A. Monitoring the accumulation and dissipation of the photosensitizer protoporphyrin IX during standard dermatological methyl-aminolevulinate photodynamic therapy utilizing non-invasive fluorescence imaging and quantification // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2011. – Vol. 8, № 1. – P. 30-38.

152. Tubby S., Wilson M., Nair S.P. Inactivation of staphylococcal

virulence factors using a light-activated antimicrobial agent // BMC microbiology. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 1-10.

153. Volz E., Hill V., McCrone J.T., Price A., Jorgensen D., O'Toole Á., Allan J. Evaluating the effects of SARS-CoV-2 spike mutation D614G on transmissibility and pathogenicity // Cell. – 2021. – Vol. 184, № 1. – P. 64-75.

154. Wagner S.J. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes // Transfusion Medicine Reviews. – 2002. – Vol. 16, № 1. – P. 61-66.

155. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) // The Journal of antimicrobial chemotherapy. – 1998. – Vol. 42., № 1. – P. 13-28.

156. Wainwright M. Pathogen inactivation in blood products // Current medicinal chemistry. – 2002. – Vol. 9, № 1. – P. 127-143.

157. Wainwright M. Anti-infective dyes in the time of COVID // Dyes and Pigments. – 2021. – Vol. 196. – art. 109813.

158. Wainwright M., Maisch T., Nonell S., Plaetzer K., Almeida A., Tegos G.P., Hamblin M.R.I. Photoantimicrobials—are we afraid of the light? // The Lancet Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 17, № 2. – P. e49-e55.

159. Walls A.C., Park Y.J., Tortoric M.A., Wall A., McGuire A.T., Veessler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // Cell. – 2020. – Vol. 181, № 2. – P. 281-292. e6.

160. Warriar A., Mazumder N., Prabhu S., Satyamoorthy K., Murali T.S. Photodynamic therapy to control microbial biofilms // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2021. – Vol. 33. – art. 102090. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>

161. Weber H.M., Mehran Y.Z., Orthaber A., Saada H.H., Weber R., Wojcik M. Successful reduction of SARS-CoV-2 viral load by photodynamic therapy (PDT) verified by QPCR—A novel approach in treating patients in early infection stages // Med. Clin. Res. – 2020. – Vol. 5, № 11. – P. 311-325.

162. WHO COVID-19 Dashboard. 2022. [Electronic resource]. – WHO, 2022. – Access mode online: <https://covid19.who.int>. [(accessed on 31 Oct 2022)].

163. Wiehe A., O'Brien J.M., Senge M.O. Trends and targets in antiviral phototherapy // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2019. –

Vol. 18, № 11. – P. 2565-2612.

164. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention // *Journal of the American Medical Association*. – 2020. – Vol. 323, № 13. – P. 1239-1242.

165. Yeung M.L., Teng J.L.L., Jia L., Zhang C., Huang C., Cai J.P., Yuen K.Y. Soluble ACE2-mediated cell entry of SARS-CoV-2 via interaction with proteins related to the renin-angiotensin system // *Cell*. – 2021. – Vol. 184, № 8. – P. 2212-2228.

166. Zhang Y., Zhu Y., Chen J., Wang Y., Sherwood M.E., Murray C.K., Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*: In vitro and in vivo studies // *Virulence*. – 2016. – Vol. 7, № 5. – P. 536-545.

167. Zhang H.L., Li Y.M., Sun J., Zhang Y.Y., Wang T.Y., Sun M.X., Cai X. Evaluating angiotensin-converting enzyme 2-mediated SARS-CoV-2 entry across species // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 296. – art. 100435. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100435.

168. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Shi Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. – 2020. – Vol. 579, № 7798. – P. 270-273.

169. Zhikhoreva A.A., Belashov A.V., Ignatov E.S., Gelfond M.L., Semenova I.V., Vasyutinskii O.S. Singlet oxygen generation in aerosol jet and on biological surfaces // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2022. – Vol. 228. – art. 112395. DOI 10.1016/j.jphoto-biol.2022.112395.

170. Ziganshyna S., Szczepankiewicz G., Kuehnert M., Schulze A., Lieber, U. G., Pietsch C., Eulenburg V., Werdehausen, R. Photodynamic Inactivation of SARS-CoV-2 Infectivity and Antiviral Treatment Effects in Vitro // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, № 6. – P. 1301. <https://doi.org/10.3390/v14061301>.

171. Zolfaghar P.S., Packer S., Singer M., Nair S.P., Bennett J., Stree C., Wilson M. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent // *BMC microbiology*. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 1-8.

ISBN 978-5-6046979-0-0



Отпечатано в ООО «АРТЕК»,
СПб, 6-я линия В.О., д. 3/10
E-mail: artek-1@mail.ru, т. +7(911) 239-25-32
Подписано в печать 15.03.23
Формат 60x90/16. Тираж 50 экз.