

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Vedrana Krušić

Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji mikroorganizama
u biofilmu

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Vedrana Krušić

Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji mikroorganizama
u biofilmu

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Nela
Malatesti

Završni rad obranjen je dana: _____

Pred povjerenstvom:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 33 stranice, 7 slika i 44 literaturna navoda.

Sažetak

Sposobnost bakterija i gljivica da tvore biofilme, sesilne zajednice mikroorganizama odgovorne za patogenezu mnogih kroničnih i perzistentnih infekcija, povećava njihovu otpornost na vanjske uvjete i doprinosi razvoju rezistencije na uobičajene antimikrobne agense. Obzirom na alarmantnu situaciju u području liječenja infekcija izazvanih patogenima koji su razvili antimikrobnu rezistenciju, raste potreba za pronalascima novih metoda liječenja. Jedan od mogućih pristupa liječenju infekcija izazvanih mikroorganizmima u biofilmu je primjena fotodinamičke inaktivacije. Fotodinamička inaktivacija mikroorganizama ima nespecifičan mehanizam djelovanja, a zasniva se na međudjelovanju ne-toksičnog fotosenzibilizatora, vidljive svjetlosti i molekularnog kisika, prilikom čega dolazi do generiranja citotoksičnih reaktivnih kisikovih vrsta i singletnog kisika. Većina fotosenzibilizatora zasniva se na tetrapirolnoj strukturi, među kojima su najzastupljeniji porfirini. Neki od porfirinskih spojeva, poput porfimer natrija i endogenog protoporfirina IX, već se primjenjuju kao fotosenzibilizatori u terapiji nekih karcinoma, a sada se razmatra njihova mogućnost upotrebe u inaktivaciji mikroorganizama u biofilmu. Oba su ostvarila značajnu inaktivaciju kod ispitivanih biofilmova. Drugi fotosenzibilizatori su još u eksperimentalnoj fazi te njihovo djelovanje nije dovoljno ispitano. Unatoč značajnoj inaktivaciji postignutoj kod planktonskih mikroorganizama, tetrakationski 5,10,15,20-tetra-(*N*-metilpiridin-4-il)porfirin tetra-(*p*-toluensulfonat) nije postigao zadovoljavajuću efikasnost kod većine ispitivanih biofilmova. Dikationski 5,15-bis-[4-(3-trimetilamonio)propiloksi]fenil]porfirin diklorid pokazao se kao efikasan fotosenzibilizator u inaktivaciji gljivičnih biofilmova, no još uvijek nedostaju istraživanja o njegovoj djelotvornosti na biofilmovima bakterijskog podrijetla.

Ključne riječi: fotodinamička inaktivacija, biofilm, antimikrobna rezistencija, fotosenzibilizatori, porfirini

Summary

The ability of bacteria and fungi to form biofilms, sessile communities of microorganisms responsible for the pathogenesis of many chronic and persistent infections, increases their hardiness to external conditions and contributes to the development of resistance to conventional antimicrobial agents. Given the alarming situation in the field of treating infections caused by pathogens that have developed antimicrobial resistance, there is a growing need for discoveries of new treatment methods. One of the possible approaches to treatment of infections caused by microorganisms in biofilm is the use of photodynamic inactivation. Photodynamic inactivation of microorganisms has a non-specific mechanism of action, based on the interaction of non-toxic photosensitizers, visible light and molecular oxygen, resulting in the generation of cytotoxic reactive oxygen species and singlet oxygen. Most photosensitizers are based on the tetrapyrrolic structure, with a high prevalence on the use of porphyrins. Some porphyrin compounds, such as porfimer sodium and endogenous protoporphyrin IX, are already being used as photosensitizers in the therapy of some cancers, and their potential for inactivation of microorganisms in biofilm is under investigation. Both photosensitizers have caused significant inactivation of the tested biofilms. Other photosensitizers are still in the experimental stage and their activity has not yet been sufficiently studied. Despite the significant inactivation achieved in planktonic microorganisms, tetracationic 5,10,15,20-tetra-(*N*-methylpyridinium-4-yl) porphyrin tetra-(*p*-toluenesulfonate) did not achieve satisfactory efficacy in most of the biofilms studied. Dicationic 5,15-bis-[4-(3-trimethylammonio-propyloxy) phenyl]porphyrin dichloride has shown to be an efficient photosensitizer in the inactivation of fungal biofilms but there is still no research on its efficacy in biofilms of bacterial origin.

Key words: photodynamic inactivation, biofilm, antimicrobial resistance, photosensitisers, porphyrins

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Cilj	6
3.	Fotodinamička inaktivacija mikroorganizama u biofilmu	7
3.1.	Podložnost različitih vrsta mikroorganizama prema fotodinamičkoj inaktivaciji	8
3.2.	Primjene fotodinamičke inaktivacije mikroorganizama u biofilmu	9
4.	Porfirini	11
4.1.	Razvoj porfirinskih fotosenzibilizatora	12
4.2.	Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji mikroorganizama u biofilmu	14
4.2.1.	Porfimer natrij (Photofrin)	15
4.2.2.	Protoporfirin IX	18
4.2.3.	5,10,15,20-tetra-(<i>N</i> -metilpiridin-4-il) porfirin tetra-(<i>p</i> -toluensulfonat) (TMPyP)	22
4.2.4.	5,15-bis-[4-(3-trimetilamoniopropiloksi)fenil] porfirin diklorid (XF-73)	26
5.	Zaključak	28
6.	Literatura	30

1. Uvod

Biofilmovi predstavljaju značajan problem za zdravlje ljudi te su uzrok širokog raspona infekcija. Prema trenutno uvaženoj definiciji Donlana i Costertona iz 2002. (1), biofilmovi su sesilne zajednice mikroorganizama koji su ireverzibilno povezani međusobno i sa supstratom te su uklopljeni u matricu izvanstanične polimerne tvari (eng. *extracellular polymeric substance*, EPS), koju su sami stvorili i pokazuju izmijenjen fenotip obzirom na brzinu rasta i transkripciju gena u usporedbi sa slobodnoživućim (planktonskim) mikroorganizmima. Biofilmovi su sveprisutni u prirodi i mogu nastati na gotovo svim vrstama površina. Najefikasnije rastu na vlažnim i mokrim mjestima te mogu biti bakterijskog ili gljivičnog podrijetla. Mogu se sastojati od samo jedne, ali i više različitih vrsta mikroorganizama koje tvore zajednički biofilm. (1) Jedna od glavnih karakteristika biofilмова je njihova povećana rezistencija na antimikrobne agense. Rezistencija mikroorganizama u biofilmu posljedica je kombinacije brojnih biokemijskih faktora, kao što su struktura EPS-a, aktivacija efluks pumpi, enzimatska degradacija antibiotika te detekcija kvoruma (eng. *quorum sensing*). Uz biokemijske faktore važnu ulogu imaju i molekularni mehanizmi horizontalnog prijenosa gena i mutacije mikroorganizama u biofilmu te okolišni faktori koji utječu na biofilm. (2) Svi navedeni faktori i mehanizmi uspješno pridonose rezistenciji upravo zbog specifične strukture biofilмова, koja osigurava mikroorganizme unutar biofilma od potencijalno štetnih vanjskih utjecaja.

Iako postoje univerzalne karakteristike koje vrijede za sve biofilmove, kao što je to stvaranje EPS-a sastavljenog primarno od polisaharida, postoje značajne razlike u strukturi svakog biofilma. Struktura ovisi o vrsti mikroorganizma koji formira biofilm te o vanjskim faktorima i dostupnosti nutrijenata. (3) EPS u kojega su uklopljeni mikroorganizmi može imati vrlo različita kemijska i fizička svojstva. Kod Gram-negativnih (Gr-) bakterija uočeno je da se EPS uglavnom sastoji od neutralnih i polianionskih

polisaharida. To svojstvo omogućava vezanje bivalentnih kationa poput kalcija i magnezija i njihovo uklapanje u EPS. Kemijska svojstva EPS-a Gram-pozitivnih (Gr+) bakterija nešto su drugačija te EPS može biti i kationske prirode. Općenito, EPS može u svoju strukturu vezati razne metalne ione, bivalentne katione i razne makromolekule poput proteina, DNA i lipida. Visoko je hidratiziran jer može vezati veliki broj molekula vode vodikovim vezama. Time osigurava mikroorganizme od isušivanja. Također stvara i fizičku barijeru čime onemogućava prodor antimikrobnih agenasa u unutarne dijelove biofilma te pridonosi pojavi rezistencije. (4)

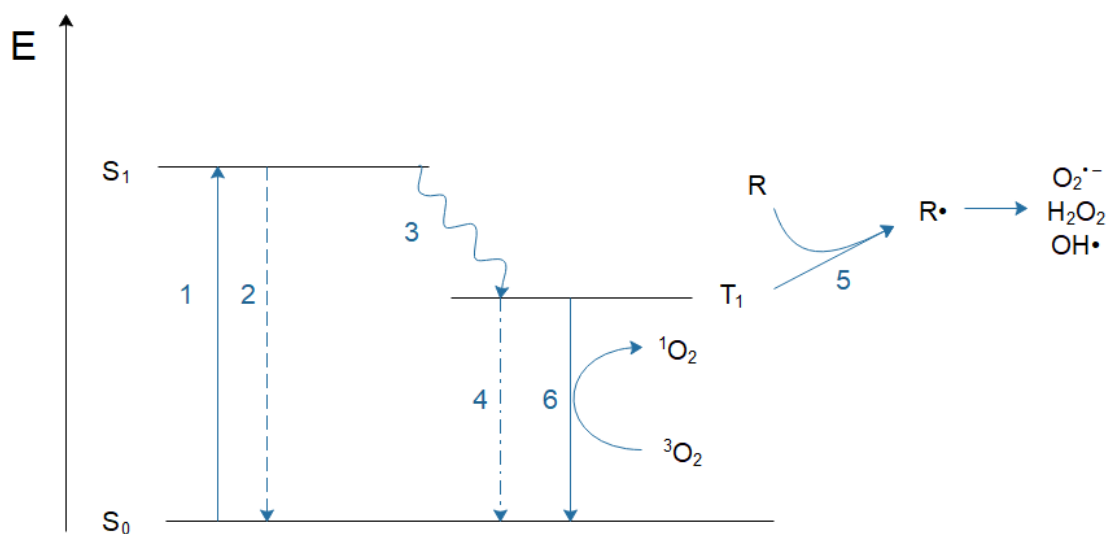
Prema podacima NIH (National Institute of Health; PA-07-288; Immunology of Biofilms), i do 80% infekcija uzrokovano je biofilmovima. Najčešće infekcije izazvane biofilmovima su endokarditis, osteomijelitis, sinusitis, infekcije urinarnog trakta, kronični prostatitis, periodontitis, kronične upale pluća kod oboljelih od cistične fibroze, upale srednjeg uha te razne bolničke infekcije. Često je riječ o perzistentnim i kroničnim infekcijama koje loše reagiraju na tretmane uobičajenim antimikrobnim lijekovima. (5) Infekcije mogu biti posljedica rasta biofilma na tkivu domaćina, primjerice u dišnim putevima ili u uhu, ali izvor zaraze mogu biti i ugrađena medicinska pomagala, endoproteze i implantati. (1,5) Biofilmovi se formiraju i u vodoopskrbnim sustavima gdje također stvaraju potencijalni izvor zaraze. (1) Kako bi se uspješno eliminirali biofilmovi i prevenirale bolesti koje oni izazivaju, raste potreba za pronalaskom novih strategija eliminacije biofilmova koje neće biti toliko podložne razvoju rezistencije.

Jedan od mogućih pristupa ovom problemu je fotodinamička inaktivacija (eng. *Photodynamic inactivation*, PDI) mikroorganizama. PDI mikroorganizama se temelji na fotokemijskim reakcijama između netoksičnog fotosenzibilizatora (PS), svjetlosti određene valne duljine i molekularnog kisika, pri čemu dolazi do stvaranja citotoksičnih reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i singletnog kisika (1O_2). Za razliku od antibiotika koji djeluju na specifičnu staničnu komponentu bakterijske stanice i na taj način ostvaruju svoje djelovanje (princip ključ-

brava), PDI mikroorganizama omogućava simultano djelovanje na više molekularnih meta (eng. *multi-target process*) uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. (6) Osim primjene u suzbijanju infektivnih bolesti, princip fotodinamičke inaktivacije također se koristi u terapiji nekih oblika raka i određenih autoimunih oboljenja te se u tom kontekstu često naziva i fotodinamička terapija. (7) PDI mikroorganizama može uzrokovati staničnu smrt na različite načine, ovisno o tome gdje se PS lokalizira u stanici. Tako lokalizacija PS-a na plazmatskoj membrani dovodi do nekroze, na lizosomima i mitohondrijima do apoptoze, a na endoplazmatskom retikulumu do autofagije ciljane stanice. (7) Upravo zbog nespecifičnog načina djelovanja na više različitih staničnih meta umanjuje se rizik od razvoja rezistencije na ovaj oblik terapije.

Mehanizam PDI zasniva se na pobuđivanju molekula PS-a svjetlošću određene valne duljine. Prilikom osvjetljavanja molekule PS-a, ona prelazi iz stanja najniže energije (osnovnog singletnog stanja, S_0), u kratkoživuće, pobuđeno singletno stanje (S_x , $x=1,2,3,\dots$). Pobuđeno stanje je energetski nepovoljno te se molekula vrlo brzo vraća u osnovno stanje, a to može postići na više načina. Molekula PS-a može iz prvog pobuđenog singletnog stanja (S_1) preći natrag u S_0 emitiranjem energije u obliku fluorescencije. No, iz S_1 molekula također može međusustavnim prijelazom (eng. *intersystem crossing*) preći u pobuđeno triplet stanje (T_1) pri čemu dolazi do promjene spina elektrona. Iz T_1 molekula se može vratiti u S_0 fosforescencijom, no obzirom da je T_1 stanje relativno dugoživuće u usporedbi sa S_1 , do povratka u S_0 može doći i preko dva tipa fotokemijskih reakcija nazvanih mehanizam tipa I i mehanizam tipa II. (8) Kod mehanizma tipa I dolazi do transfera elektrona sa PS-a na supstrat. Uobičajeni terminalni supstrat kod reakcija tipa I je molekularni kisik, te dolazi do stvaranja superoksidnog aniona ($O_2^{\bullet-}$). U biološkim sustavima $O_2^{\bullet-}$ nije pretjerano reaktivan, no može dovesti do nastanka vodikovog peroksida (H_2O_2) te vrlo reaktivnog hidroksilnog radikala ($\bullet OH$). Oni oksidiraju biomolekule što dovodi do staničnih oštećenja, koja na kraju

rezultiraju staničnom smrću. Kod mehanizma tipa II dolazi do prijenosa energije sa PS-a na molekularni kisik, pri čemu PS reagira izravno sa molekulom kisika te dolazi do nastanka visoko reaktivnog $^1\text{O}_2$. Vrijeme poluživota $^1\text{O}_2$ vrlo je kratko, što osigurava da do citotoksičnog efekta dolazi samo lokalno na mjestu gdje se nalazi PS u trenutku osvjetljivanja. Smatra se da upravo $^1\text{O}_2$ najviše doprinosi oksidativnom oštećenju i staničnoj smrti. Omjer u kojem se ove reakcije odvijaju ovisi o prirodi samog PS-a i njegovoj koncentraciji te dostupnosti kisika. (8,9) Shematski prikaz navedenih procesa prikazan je preko Jablonskog dijagrama na slici 1.



Slika 1: Pojednostavljeni prikaz Jablonskog dijagrama. Fotofizikalni procesi prikazani na slici: 1) apsorpcija, 2) fluorescencija, 3) međusustavni prijelaz, 4) fosforescencija, 5) prijenos elektrona (mehanizam tipa I), 6) prijenos energije (mehanizam tipa II); vertikalna os predstavlja energiju; prema (10)

Osnovno svojstvo molekule PS-a je da apsorbira svjetlost te da apsorbiranu energiju može prenijeti na supstrat. To su obično planarne, visoko konjugirane, nezasićene organske molekule s visokim apsorpcijskim koeficijentom u vidljivom i bliskom ultraljubičastom području spektra. (11) Dobar PS mora ispunjavati određene uvjete, koji uključuju veliku fototoksičnost, visok kvantni prinos (Φ_Δ) za stvaranje dugoživućeg triplet stanja, visok Φ_Δ za stvaranje $^1\text{O}_2$, visok afinitet vezanja za mikroorganizme i nizak afinitet vezanja za ljudske stanice. PS ne smije biti toksičan u mraku,

ne smije imati mutagena svojstva, treba biti topljiv u vodi te ne smije stvarati agregate. (7,9) Većina do sada istraženih PS-a ima tetrapirolnu strukturu, među kojima razlikujemo porfirine, klorine, bakterioklorine i ftalocijanine. Među ne-tetrapirolnim PS-ima ističu se fenotiazinske boje poput metilen plave i toluidin plave te prirodni spojevi poput hipericina i kurkumina. (12) Ovaj rad prvenstveno se fokusira na do sada istražene porfirinske PS-e i njihovu efikasnost u fotodinamičkoj inaktivaciji bakterijskih i gljivičnih biofilmova.

2. Cilj

Cilj rada je analizirati mogućnost primjene porfirina u PDI mikroorganizama u biofilmu te napraviti pregled *in vitro* istraživanja do sada ispitanih porfirinskih spojeva i usporediti njihovu djelotvornost za primjenu na biofilmovima različitih vrsta mikroorganizama.

3. Fotodinamička inaktivacija mikroorganizama u biofilmu

PDI mikroorganizama u biofilmu odvija se u dva koraka. U prvom koraku dolazi do vezanja PS-a za površinu biofilma. Tokom vezanja može se dogoditi da PS ostane potpuno zarobljen u EPS-u ili da uspije prodrijeti do površine mikrobnih stanica u biofilmu. Ovisno o tipu, neki se PS-i vežu na površinu ciljne stanice, dok neki mogu proći kroz plazmatsku membranu, unutar ciljne stanice. Drugi korak PDI započinje osvjetljavanjem PS-a svjetlošću, pri čemu dolazi do generiranja velike količine ROS-a i $^1\text{O}_2$. Oni uzrokuju oksidativna oštećenja u EPS-u te na površini i unutar mikrobnih stanica, ovisno o lokalizaciji PS-a u trenutku osvjetljivanja. (13) Obzirom da dolazi do istovremenih nespecifičnih napada na više staničnih meta, vjerojatnost za stvaranje rezistencije mikroorganizama prema ovom obliku terapije je minimalna. Poznato je da su mikroorganizmi u biofilmu i do 1000 puta otporniji na uobičajene antimikrobne agense, stoga je nespecifičnost PDI jedna od glavnih prednosti ovog tretmana. (12)

Prva linija obrane mikroorganizama u biofilmu je EPS te je stoga jedna od glavnih meta PDI. Oksidacijom makromolekula koje sačinjavaju EPS (polisaharidi, proteini, lipidi i DNA), mikroorganizmi u biofilmu gube svoju zaštitu od vanjskih utjecaja. (13) Posljedično, može doći do raspadanja dijelova biofilma, čime se onemogućava daljnja kolonizacija te se inhibira prijenos rezistentnih gena među mikroorganizmima. Kidanje matrice biofilma smatra se sekundarnom anti-biofilmskom aktivnošću PDI biofilmova. (14) Što se tiče same PDI mikroorganizama, do letalnog efekta prvenstveno dolazi zbog oštećenja DNA i citoplazmatske membrane. Oksidacija dušičnih baza, ponajviše gvanina, te jednostruki i dvostruki lomovi DNA uzvojnice važan su mehanizam PDI mikroorganizama, dok oštećenja membrane mogu uzrokovati curenje staničnog sadržaja i inaktivaciju membranskih transportnih proteina što zajedno dovodi do

ubijanja mikrobnih stanica. (15) Na taj način inaktivacija mikroorganizama zajedno uz kidanje matrice biofilma osiguravaju dvojno djelovanje PDI.

3.1. Podložnost različitih vrsta mikroorganizama prema fotodinamičkoj inaktivaciji

Razlike u podložnosti PDI Gr+ i Gr- bakterija te gljivica proizlaze iz razlika u njihovoj građi, koja predstavlja vrlo važan faktor prilikom odabira prikladnog PS-a za PDI mikroorganizama. Stanična stijenka Gr- bakterija sastoji se od tankog sloja peptidoglikana, okruženog s citoplazmatskom membranom s unutarne, i vanjskom staničnom membranom s vanjske strane stijenke. (16) Vanjska membrana Gr- bakterija asimetrične je strukture te se uglavnom sastoji od izrazito negativno nabijenih lipopolisaharida (LPS), fosfolipida, lipoproteina i porina. Takva strukturna organizacija vanjske membrane Gr- bakterija onemogućava prolazak većini molekula, što doprinosi rezistenciji ove vrste bakterija. Porini omogućavaju difuziju tek malenim hidrofилnim molekulama, molekularne mase do 700 Da. (16,17) S druge strane, Gr+ bakterije ne sadrže vanjsku membranu. Njihova stanična stijenka sastoji se od više slojeva peptidoglikana koji prekriva citoplazmatsku membranu. Dodatna komponenta stijenke Gr+ bakterija je negativno nabijena teihoična kiselina koja može biti kovalentno vezana s peptidoglikanom ili pak usidrena u citoplazmatsku membranu te se tada naziva lipoteihoična kiselina. (16) Za razliku od Gr- bakterija, stijenka Gr+ bakterija mnogo je poroznija te može propustiti makromolekule molekularne mase 30000-60000 Da, čime ne predstavlja zapreku za prolazak većini PS-a, čija je prosječna molekulska masa oko 1500-1800 Da. (17)

Za razliku od prokariotskih bakterija, gljivice spadaju u carstvo eukariota te imaju kompleksniju unutarstaničnu strukturu od bakterija. Gljivice su generalno relativno manje podložne PDI od bakterija zbog razlike u veličini samih stanica. Stanice gljivica mnogo su veće od bakterijskih stanica te je količina ROS-a potrebna za ubijanje takve stanice mnogo veća

od one potrebne da ubije bakterijsku stanicu. (18) Stanična stijenka gljivica je slojevita i razlikuje se ovisno o vrsti gljivice, no prvenstveno se sastoji od glikoproteina i polisaharida, od kojih su najzastupljeniji polimeri glukana, manana i hitina. Permeabilnija je od stanične stijenke Gr-, ali manje permeabilna od stijenke Gr+ bakterija. (19,20)

3.2. Primjene fotodinamičke inaktivacije mikroorganizama u biofilmu

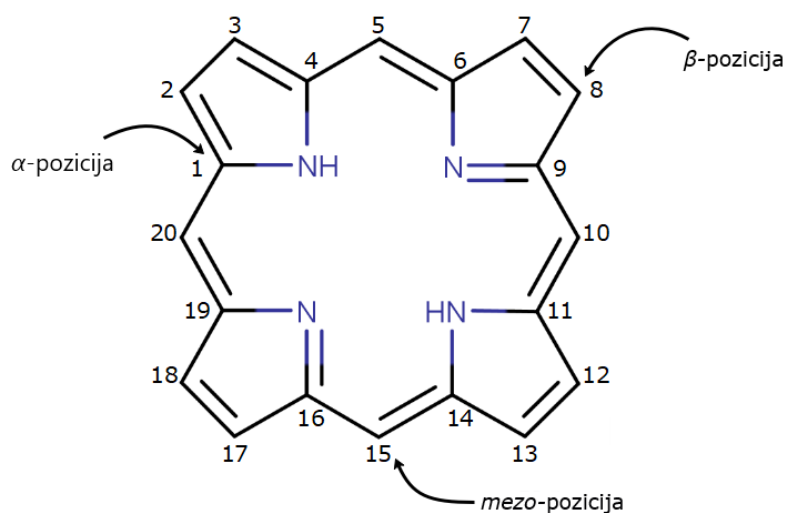
Obzirom na velik broj infekcija uzrokovanih biofilmovima i sve učestaliju pojavu rezistencije na antimikrobne agense, potrebno je razmotriti potencijalna područja kliničke primjene PDI mikroorganizama u biofilmovima. Pri tome treba uzeti u obzir ograničenja ove vrste terapije, kao što je mogućnost dostave svjetlosti na mjesto infekcije. Stoga se kao glavno područje kliničke primjene nameću lokalizirane i lako dostupne infekcije. PDI mikroorganizama u biofilmu lako je primjenjiva kod endodontalnih i oralnih infekcija, upala srednjeg uha, inficiranih rana i opekline te kožnih infekcija. (11) Primjeri takvih mikroorganizma koji tvore biofilme u čovjeka su bakterije *Streptococcus mutans*, jedan od glavnih uzročnika nastanka zubnog karijesa, *Moraxella catarrhalis*, uzročnik upale uha i dišnih puteva, i *Staphylococcus aureus*, patogen koji uzrokuje cijeli niz infekcija od kojih su najčešće infekcije na koži i postoperativne infekcije kirurških rana te opekline. Tu također treba spomenuti i gljivicu *Candida albicans*, jednu od glavnih uzročnika gljivičnih oboljenja kod ljudi. (21–24) Upravo su ovi, ali i mnogi drugi mikroorganizmi predmet istraživanja kliničke primjene PDI u inaktivaciji mikroorganizama u biofilmova, od kojih su neka analizirana u nastavku ovog rada.

Osim primjene u kliničke svrhe, PDI mikroorganizama u biofilmu može se primijeniti i u drugim područjima, a jedno od njih razmotreno je u istraživanju PDI biofilmova bakterije *Listeria monocytogenes*. (25) Autori kao jedno od područja primjene vide u dezinfekciji tvorničkih strojeva za preradu hrane, kao i površina koje dolaze u dodir s hranom te ambalaže za

pakiranje kako bi se spriječila moguća izbijanja zaraze ovim patogenom koji se uglavnom prenosi upravo putem hrane.

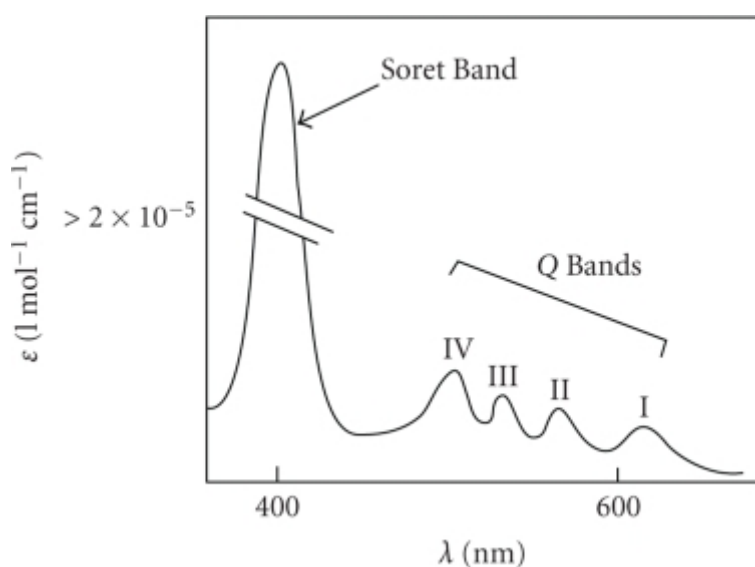
4. Porfirini

Porfirini su razred intenzivno obojenih heterocikličkih aromatskih spojeva. Ovi spojevi sveprisutni su u prirodi, gdje predstavljaju ključnu kariku u brojnim biokemijskim procesima poput transporta kisika (hem) i fotosinteze (klorofil). (26) Kostur svakog porfirina je porfin, prikazan na slici 2. To je planarni makrociklički spoj koji se sastoji od četiri pirolne podjedinice povezane na α -ugljikovim atomima/pozicijama (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 i 19, slika 2) preko metinskih mostova =CH- (5, 10, 15, 20), koji predstavljaju *mezo*-ugljikove atome/pozicije. Porfin može biti supstituiran na nekom od *mezo*- ili β -poziciji (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 i 18). Ukoliko se na tim pozicijama nalaze atomi koji nisu vodik, radi se o porfirinskom spoju. Unutarnja dva protona mogu se ukloniti snažnom bazom poput alkoksida, čime se dobiva dianionska struktura. Međutim, unutarnja dva piroleninska dušika mogu se i protonirati kiselinama poput trifluoracetatne kiseline čime se dobiva dikationska struktura. Porfirin koji u svom središtu ne tvori kompleks s metalom naziva se slobodna porfirinska baza, dok se anionske porfirinske vrste koje tvore komplekse s metalima nazivaju metaloporfirini. (27)



Slika 2: Strukutra porfina sa prikazanim α -, β - i *mezo*- pozicijama.

Na slici 3 prikazan je tipični apsorpcijski spektar slobodne porfirinske baze. Zbog visoke konjugiranosti, porfirini imaju karakterističan spektar u vidljivom i ultraljubičastom području. Spektar porfirina sastoji se od jednog intenzivnog pika pri valnoj duljini između 400 i 430 nm koji se naziva Soretova vrpca (eng. *Soret band*) i od serije četiri slabijih pikova u regiji između 500 i 700 nm koji se nazivaju Q vrpce (eng. *Q bands*). (26) Stvaranje kompleksa s metalima i različiti supstituenti porfirina mogu utjecati na apsorpcijski spektar porfirina. Stoga je važno poznavanje apsorpcijskog spektra ispitivanog spoja pri odabiru izvora svjetlosti za PDI.



Slika 3: Modificirani apsorpcijski spektar porfirina s označenom Soretovom i Q vrpcoma. Vertikalna os prikazuje molarni apsorpcijski koeficijent u $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a horizontalna os valnu duljinu u nm. (27)

4.1. Razvoj porfirinskih fotosenzibilizatora

Prva generacija fotosenzitizatora sastojala se od porfirina prirodnog podrijetla i njihovih derivata. Početkom 20. stoljeća uočeno je da hematoporfirin (Hp), dobiven kiselo kataliziranom hidrolizom iz hemoglobina, ima jako fototoksično djelovanje te da se lokalizira u tumorskim tkivima. U pokušaju pročišćavanja Hp, Schwartz je 1955. sintetizirao derivat hematoporfirina (eng. *Hematoporphyrin derivate*, HpD). Iako je stvorio novi spoj, pokazalo se da se HpD puno efikasnije lokalizira u

tumorskim tkivima od Hp. Tijekom 1980-ih godina otkriveno je da je aktivna frakcija HpD (Photofrin) mješavina porfirinskih oligomera te je odobren za terapiju pojedinih vrsta karcinoma u više zemalja. (28,29)

Glavni nedostaci HpD-a i Photofrina su kompleksan sastav, slaba apsorpcija svjetlosti i produžena fotosenzitivnost kod pacijenata, što je dovelo do razvoja druge generacije PS-a. Druga generacija PS-a su kemijski čiste tvari poboljšane fotosenzitivnosti, apsorpcijskog spektra i selektivnosti u usporedbi sa prvom generacijom. Većina PS-a druge generacije srodni su sa porfirinima te među njih spadaju benzoporfirini, purpurini, teksapirini, ftalocijanini, naftalocijanini, klorini, bakterioklorini, protopofrin IX (PpIX) te 5-aminolevulinska kiselina kao biološki prekursor PpIX. (29,30) Treća generacija PS-a nastala je modificiranjem PS-a druge generacije, na način da se poboljša njihova dostava tako da se postojeći PS konjugira sa biološkim makromolekulama poput monoklonalnih antitijela ili pak enkapsulacija PS-a u nanonosače poput liposoma. (30)

Fiziokemijska svojstva porfirina izravno utječu na njegovu efikasnost u PDI određene vrste mikroorganizama. Naboj supstituenata na porfirinskom prstenu ima velik utjecaj na afinitet porfirina prema ciljnim stanicama. Pokazalo se da anionski i neutralni porfirini imaju visok afinitet prema Gr+ bakterijama, ali samostalno najčešće nisu djelotvorni u PDI Gr- bakterija. (31) Njihovu djelotvornost u fotoinaktivaciji Gr- bakterijama moguće je povećati prethodnim tretmanom kationskim polipeptidom polimiksinom B koji destabilizira staničnu membranu i olakšava ulazak PS-u ili pak kelirajućim sredstvima poput etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA-e), koja će ukloniti bivalentne katione (Mg^{2+} , Ca^{2+}) i povećati permeabilnost stanične stjenke Gr- bakterija. (32,33) S druge strane, uočeno je da kationski PS-i efikasno inaktiviraju i Gr+ i Gr- bakterije te gljivica bez prethodnih tretmana permeabilizirajućim sredstvima. (33)

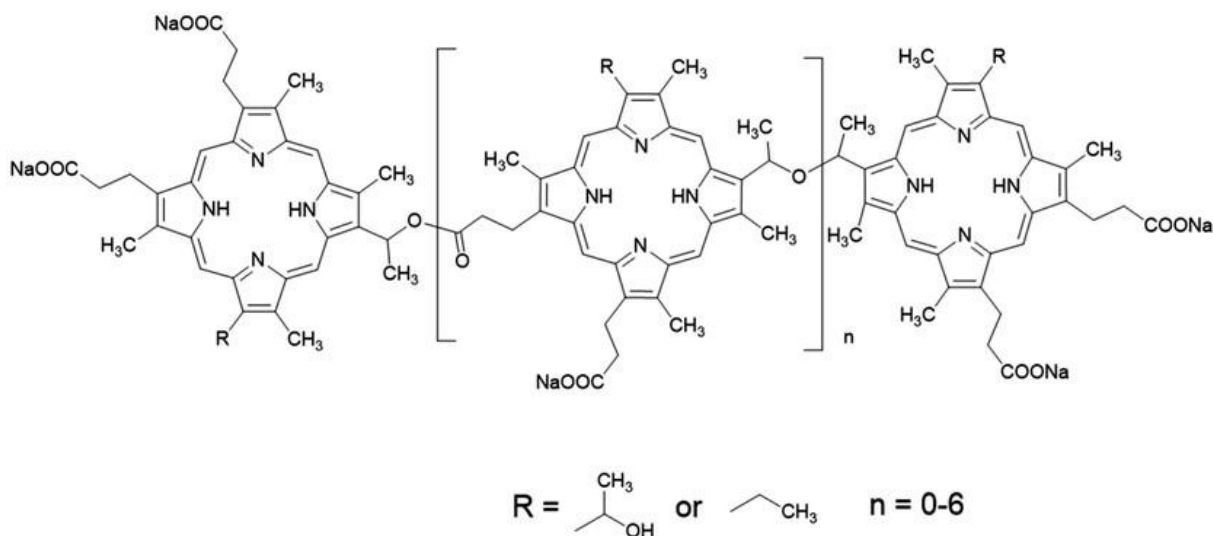
4.2. Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji mikroorganizama u biofilmu

Istraživanja opisana u ovom rada provedena su na *in vitro* uzgojenim biofilmovima. U većini istraživanja je za utvrđivanja vijabilnosti stanica biofilma nakon tretmana korištena metoda brojanja jedinica koje tvore kolonije (eng. *colony forming unit assay*, CFU esej). Rezultati su izražavani kao logaritmi po bazi 10 od ukupnog broja CFU. Kako bi se određeni tretman mogao proglasiti antimikrobnim ili baktericidnim, mora ostvariti 3 ili više \log_{10} smanjenje broja CFU/mL.

U nastavku su analizirana istraživanja koja su kao PS-ove koristili porfimer natrij, protoporfirin IX, 5,10,15,20-tetra-(*N*-metilpiridin-4-il) porfirin tetra-(*p*-toluensulfonat) i 5,15-bis-[4-(3-trimetilamonio)propiloksi] fenil] porfirin diklorid.

4.2.1. Porfimer natrij (Photofrin)

Porfimer natrij, poznatiji pod prodajnim imenom Photofrin, prvi je PS odobren od strane FDA za primjenu u fotodinamičkoj terapiji. Odobren je za palijativnu terapiju raka jednjaka, teške displazije kod oboljelih od Berettovog sindroma te raka pluća ne-malih stanica, no uočeno je da je efikasan i za antimikrobnu PDI mikroorganizama. Porfimer natrij je pročišćeni derivat Hp-a te nije jedinstveni kemijski entitet, već se radi o mješavini oligomera porfirina povezanih eterskim i esterskim vezama. Njegova struktura prikazana na slici 4. Ima relativno nizak molarni apsorpcijski koeficijent od oko $3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pri 630 nm, pri koliko ostvaruje apsorpcijski maksimum u crvenom dijelu spektra, no zato ima vrlo visok kvantni prinos $^1\text{O}_2$ koji iznosi $\Phi_{\Delta}=0,89$. (34) Efikasnost porfimer natrija ispitana je na biofilmovima Gr+ bakterije *Streptococcus mutans*, Gr- bakterije *Moraxella catarrhalis* i gljivice *Candida albicans*. (21–23)



Slika 4: Kemijska struktura porfimer natrija. (35)

Biofilmovi *S. mutans* prethodno tretirani porfimer natrijem osvjetljeni su laserom pri valnoj duljini od 630 nm u trajanju od 5 minuta te je doza svjetlosti iznosila 30 J/cm^2 . Vijabilnost stanica utvrđivana je kolorimetrijskim esejem almarBlue. Studija je pokazala da je porfimer natrij, u koncentraciji $125 \mu\text{g/ml}$ i inkubacijskom vremenu od 5 minuta,

uzrokovao značajno smanjenje vijabilnosti stanica bakterija biofilma u odnosu na vijabilnost stanica kontrolnih skupina. (21)

U studiji provedenoj na *M. catarrhalis* također je korišten porfimer natrij u koncentraciji od 125 µg/ml, uz produženo inkubacijsko vrijeme porfimer natrija u trajanju od 25 minuta. Tretirani uzorci osvijetljeni su laserom pri valnoj duljini od 630 nm te je doza dostavljene svjetlosti iznosila 225 J/cm². Vijabilnost bakterija nakon tretmana utvrđena je CFU esejem te su biofilmovi promatrani skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Rezultati su pokazali da je tretman postigao 3-4 log₁₀ smanjenja broja CFU/mL, što odgovara ubijanju 99,9-99,99% bakterija. Pomoću SEM-a je također potvrđeno da je tretman uzrokovao značajna stanična oštećenja. (22)

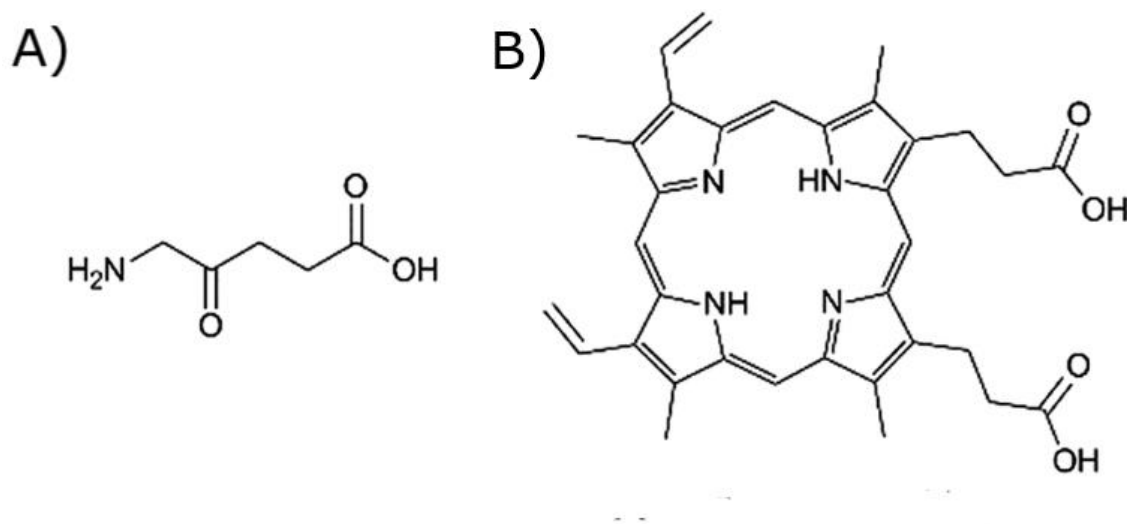
Biofilmovi *C. albicans* inkubirani su 30 minuta s porfimer natrijem u koncentraciji od 10 µg/mL te osvijetljeni živinom lampom s filterom koji je propuštao svjetlost valne duljine u rasponu 400-700 nm. Doze svjetlosti su ovisno o vremenu osvijetljavanja iznosile 0,9-18 J/cm². Metabolička aktivnost tretiranih biofilmova određivana je XTT testom i uspoređena sa metaboličkom aktivnošću biofilmova iz kontrolnih skupina. Paralelno je provedeno i testiranje na biofilmovima tretiranima sa amfotericinom B, koji je odabran kao predstavnik konvencionalnih antimikotika, kako bi bilo moguće napraviti usporedbu efikasnosti PDI porfimer natrijem i klasične terapije korištene kod gljivičnih oboljenja. Rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje metaboličke aktivnosti kod uzoraka kod kojih je proveden PDI porfimer natrijem u usporedbi sa kontrolnim skupinama, kao i u usporedbi sa skupinom tretiranom amfotericinom B. (23)

Porfimer natrij pokazao se kao efikasan PS u PDI biofilmova *S. mutans*, *M. catarrhalis* i *C. albicans* pri gore navedenim uvjetima, s time da je važno uzeti u obzir razlike u primijenjenim koncentracijama PS-a kao i u dozi svjetlosti. Obzirom da porfimer natrij spada u ne-kationske PS-e, bilo je očekivano da će postići značajno bolji učinak kod Gr⁺ bakterija i gljivica nego kod Gr⁻ bakterija. Stoga su iznenađujuća efikasnost porfimer natrija

pri PDI biofilmova *M. catarrhalis*, obzirom da PDI ne-kationskim PS-ima bez prethodnog tretmana permeabilizirajućim sredstvima do sada nije pokazao značajnu efikasnost u inaktivaciji Gr- bakterija. (31) Autori su pretpostavili da je postignuti učinak na biofilmovima *M. catarrhalis* vjerojatno proizašao iz razlika u permeabilnosti stanične membrane ili putu unosa kod ove vrste bakterija. Također predlažu da treba provesti daljnja istraživanja o potencijalnom utjecaju ekspresije lipooligosaharida (LOS) umjesto LPS-a na površini stanica *M. catarrhalis* te provjeriti jesu li i druge bakterije koje na svojoj staničnoj stijenci ekspimiraju LOS-ove također podložnije PDI posredovanoj porfimer natrijem u odnosu na ostale Gr- bakterije. (22) U istraživanju na biofilmovima *C. albicans*, porfimer natrij također je doveo do značajne inaktivacije stanica biofilma te se pokazao efikasnijim od amfotericina B. Problem kod navedenih istraživanja je što u ispitivanjima na biofilmovima *S. mutans* i *C. albicans* nakon tretmana nije napravljen CFU esej, što otežava usporedbu dobivenih rezultata. Provedenim kolorimetrijskim testovima može ustvrditi da je postignuta određena razina inaktivacije mikroorganizama, ali ne i da li je postignut antibakterijski, odnosno antifungalni učinak.

4.2.2. Protoporfirin IX

Protoporfirin IX (PpIX) je spoj prisutan u živim stanicama i posljednji je međuprodukt u biosintetskom putu nastanka hema. Radi se o visoko konzerviranom biosintetskom putu prisutnom i kod prokariota i kod eukariota. Unatoč manjim varijacijama u tom sintetskom putu između različitih vrsta, produkcija hema započinje konverzijom 5-aminolevulinske kiseline (eng. *5-aminolevulinic acid*, 5-ALA) u porfobilinogen, a brzina nastanka PpIX ovisi o količini dostupne 5-ALA. (36) Brzina pretvorbe PpIX u hem je relativno spora, pa povećana razina 5-ALA dovodi do akumulacije veće količine PpIX u takvim stanicama. Obzirom da PpIX ima fotosenzibilizirajuća svojstva, J. C. Kennedy i njegovi suradnici došli su na ideju da umjesto primjene samog PpIX primjene metabolički prekursor ovog endogenog PS-a u svrhu fotodinamičke PDI stanica. (37) Strukture spojeva 5-ALA i PpIX prikazane su na slici 5. Efikasnost uporabe 5-ALA u PDI biofilmova ispitana je na biofilmovima bakterijskih vrsta *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Klebsiella pneumoniae*. (25,38,39)



Slika 5: Kemijske strukture: A) 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA) i B) protoporfirina IX (PpIX) (40)

Studija na biofilmovima Gr+ bakterije *S. aureus* provedena je na biofilmovima sojeva osjetljivih na meticilin (eng. *methicillin sensitive Staphylococcus aureus*, MSSA) i na meticilin-rezistentnim sojevima (eng.

methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA) bakterije. Biofilmovi MSSA-a i MRSA-a inkubirani su s 5-ALA-om koncentracije 10mM, a period inkubacije iznosio je 2 sata. Nakon inkubacije biofilmovi su osvijetljeni LED lampom (svjetlost valne duljine $633\pm 10\text{nm}$). Doza svjetlosti iznosila je 360 J/cm^2 . Vijabilnost stanica nakon tretmana određena je pomoću CFU eseja, a biofilmovi su također analizirani i konfokalnim laserskim mikroskopom, uz prethodno bojanje „live/dead“ fluorescentnom bojom. Rezultati PDI posredovane 5-ALA-om nisu se znatno razlikovali između MSSA i MRSA sojeva. Kod biofilmova MSSA sojeva ostvareno je $2,56\text{ log}_{10}$ smanjenje broja CFU/mL, dok je kod biofilmova MRSA sojeva ono iznosilo $2,71\text{ log}_{10}$ smanjenje broja CFU/mL. Mikroskopskom analizom potvrđeno je da je većina bakterija inaktivirana tretmanom, s time da je većina mrtvih stanica bila grupirana u gornjim slojevima, a živih u donjim slojevima biofilmova. (38)

U studiji na Gr+ bakteriji *L. monocytogenes* proučavano je djelovanje 5-ALA u PDI biofilmova na komadićima poliolefinske folije, koja se često koristi prilikom pakiranja hrane. Obzirom da je *L. monocytogenes* patogen koji se uglavnom prenosi hranom te da do kontaminacije često dolazi prilikom tvorničkog procesuiranja i pakiranja hrane, autori su se odlučili istraživanje provesti na materijalu za pakiranje u svrhu pronalaska novih metoda dekontaminacije u proizvodnom procesu hrane. Biofilmovi *L. monocytogenes* uzgojeni su na komadićima poliolefinske folije te su zatim inkubirani 30 minuta s otopinama 5-ALA različitih koncentracija u rasponu 7,5-10 mM. Nakon inkubacije uzorci su osvijetljeni LED lampom koja emitira svjetlost valne duljine 400 nm, a ukupna doza svjetlosti iznosila je 18 J/cm^2 . Vijabilnost stanica nakon tretmana određena je CFU esejem. Fotosenzibilizirajućim tretmanom na biofilmovima postignuto je smanjenje broja CFU/mL od 1,7 do 3,1, ovisno o primijenjenoj koncentraciji 5-ALA. Na kontrolnim uzorcima nije uočena toksičnost 5-ALA u mraku. (25)

U studiji na biofilmovima Gr- bakterije *K. pneumoniae* ispitivano je djelovanje 5-ALA na 3 soja ove bakterije: soju ATCC700603, soju koji ne

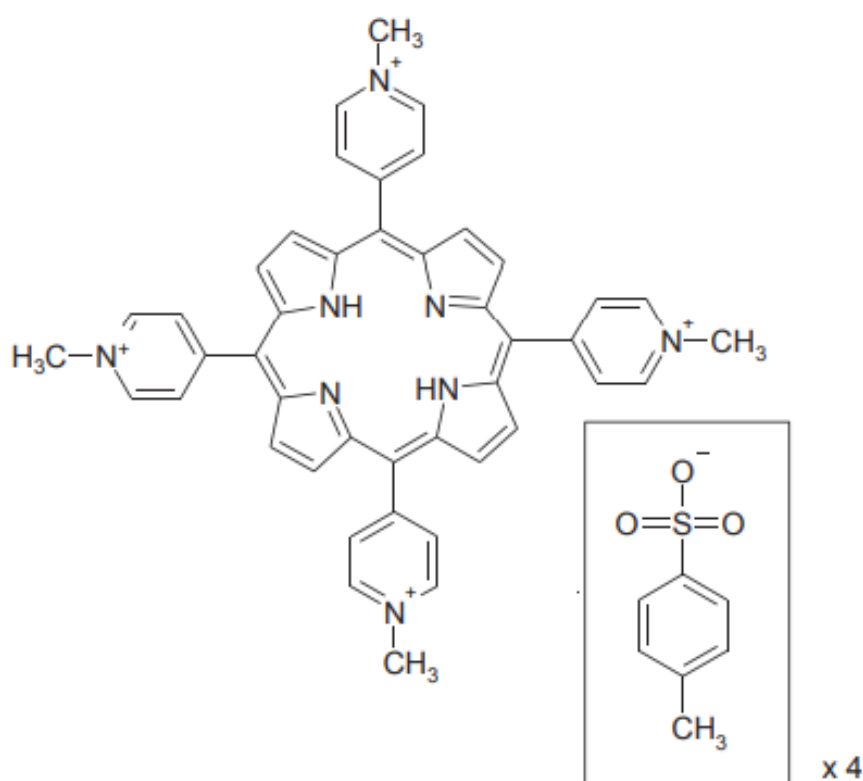
producira β -laktamaze širokog spectra (eng. *non-extended-spectrum β -lactamases*, non-ESBL) i ESBL-producirajuće soju *K. pneumoniae*. Biofilmovi sva 3 soja inkubirani su sa 5-ALA-om koncentracije 10 mM u trajanju od 4 sata. Potom su osvjetljeni ksenonskom lampom s optičkim filterom koji propušta svjetlost valne duljine 400-780 nm u trajanju od 60 minuta. Vijabilnost stanica nakon tretmana utvrđena je CFU esejem. Utvrđeno je da je tretman postigao 3,09 log₁₀ smanjenje CFU/mL kod soja ATCC700603, 1,92 log₁₀ smanjenje CFU/mL kod soja koji ne producira ESBL te 2,28 log₁₀ smanjenje CFU/mL kod ESBL-producirajućeg soja *K. pneumoniae*. Biofilmovi su također analizirani i skenirajućim elektronskim mikroskopom prije i nakon provedene PDI, čime je ustanovljeno da je nakon tretmana došlo do kidanja dijelova biofilma te da je tek mali dio bakterija ostao vezan za biofilm. Također je uočeno da je tretman uzrokovao značajna oštećenja stanične stijenke bakterija. (39)

PDI posredovana 5-ALA ostvarila je značajnu inaktivaciju bakterija u biofilmovima Gr+ bakterija *S. aureus* i *L. monocytogenes* pri niskim koncentracijama PS-a, no samo je kod biofilma *L. monocytogenes* postignut baktericidni učinak. U istraživanju na biofilmovima MSSA-e i MRSA-e nije zamijećena značajnija razlika u efikasnosti tretmana između ta dva soja. Dokazano je da je *S. aureus* podložna PDI s 5-ALA, no ne u dovoljnoj mjeri da bi bio postignut baktericidni učinak. Ipak, ovaj rezultat je važan iz razloga što je MRSA rezistentna na velik broj antibiotika i mnogo ju je teže liječiti nego infekcije izazvane MSSA-om, a ova studija je pokazala da su oba soja podjednako podložna PDI. Rezultati sugeriraju na potrebu za daljnjim ispitivanjem i usavršavanjem procedure i korištenog PS-a. Autori kao moguće rješenje predlažu kombiniranu terapiju PDI i antibiotika za potpunu inaktivaciju biofilma *S. aureus*. (38) U studiji na *L. monocytogenes* je pak razmotrena mogućnost ne-kliničke uporabe PDI bakterija u biofilmu, u svrhu dekontaminacije materijala za pakiranje hrane. I u ovom istraživanju je postignut značajan baktericidni efekt na bakterijskim biofilmovima, što sugerira da bi se trebala razmotriti

moćnost uporabe ovog tretmana u osiguranju mikrobiološke ispravnosti hrane. Autori također sugeriraju da se osim samog materijala za pakiranje ova metoda može koristiti i za dekontaminaciju površina i strojeva u proizvodnom procesu hrane. U ispitivanju biofilmova *K. pneumoniae* također je došlo do inaktivacije, ali baktericidni učinak postignut je samo kod soja ATCC700603. Kod preostala dva soja tretmanom je postignuto manje od 3 log₁₀ smanjenja broja CFU/mL, što znači da nije došlo do baktericidnog učinka. Autori pretpostavljaju da problem leži u slaboj sposobnosti 5-ALA da prođe kroz biološke membrane zbog niske lipofilnosti ove molekule. Tome u prilog govori i činjenica da je u ovoj studiji ispitivano i djelovanje metil aminolevulinata, lipofilnijeg derivata 5-ALA, koji je pri jednakim eksperimentalnim uvjetima ostvario baktericidni učinak na sva tri soja *K. pneumoniae*. (39)

4.2.3. 5,10,15,20-tetra-(*N*-metilpiridin-4-il) porfirin tetra-(*p*-toluensulfonat) (TMPyP)

5,10,15,20-tetra-(*N*-metilpiridin-4-il) porfirin tetra-(*p*-toluensulfonat) (TMPyP) je kationski porfirin čija je struktura prikazana na slici 6. Efikasnost u fotoinaktivaciji biofilmova ovog tetrakationskog PS-a sa kvantnim prinosom $^1\text{O}_2$ $\Phi_{\Delta}=0.74$ ispitana je na biofilmovima Gr+ bakterija *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*, Gr- bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i gljivice *Candida albicans*. (24,41–43)



Slika 6: Kemijska struktura TMPyP-a. (41)

Biofilmovi 3 soja *S. aureus* inkubirani su 15 minuta s TMPyP-om koncentracije 10 μM te zatim osvjetljeni bijelom svjetlošću (400-800 nm) pomoću električne lampe. Doza svjetlosti iznosila je 150 J/cm^2 . Vijabilnost stanica nakon tretmana određena je „live/dead“ testom te su uzorci zatim analizirani konfokalnim laserskim mikroskopom, čime je uočeno da je većina bakterija inaktivirana ovim tretmanom te kako su mrtve stanice prisutne u čitavom biofilmu. Kako bi se odredio postotak preživljenja,

proveden je i CFU esej kojim je utvrđeno da je TMPyP u ranije navedenim uvjetima uzrokovao tek do $2 \log_{10}$ smanjenja broja CFU/mL. Mikroskopskom analizom također je utvrđeno da je PDI uzrokovala kidanje dijelova biofilma i odvajanje bakterijskih stanica iz biofilma. (24)

U drugoj studiji ispitivan je utjecaj PDI posredovane TMPyP-om na biofilmove *E. faecalis*. Uzorci biofilma inkubirani su s otopinama TMPyP-a koncentracije $100 \mu\text{M}$ 60 minuta te su zatim osvijetljeni stomatološkom LED lampom (svjetlost valne duljine $460 \pm 20 \text{ nm}$), a doza svjetlosti je iznosila $160\text{-}170 \text{ J/cm}^2$. Nakon tretmana napravljena su serijska razrjeđenja uzoraka koja su zatim nasađena na hranjivu podlogu te je nakon 24 sata inkubacije određen broj CFU/mL. Studijom je utvrđeno da PDI posredovana TMPyP-om nije uzrokovao smanjenje broja CFU/mL, odnosno da nije došlo do inaktivacije bakterija. (41)

U studiji na biofilmovima *P. aeruginosa* korišteni su biofilmovi dva soja ove bakterije, divlji tip (eng. *wild type*, WT) i izogeni *pqsA* mutirani soj. Biofilmovi mutiranog soja sadrže znatno manje vanstanične DNA u svojem EPS-u te je mikroskopskom analizom uočeno da postoje značajne razlike u strukturi biofilмова između ova dva soja bakterije *P. aeruginosa*. Biofilmovi su inkubirani s otopinama TMPyP-a koncentracije $225 \mu\text{M}$ 10 minuta te su zatim osvijetljeni živinom lampom s filterom koji blokira svjetlost valne duljine kraće od 400 nm . Primjenjivane doze svjetlosti iznosile su $220\text{-}240 \text{ J/cm}^2$. Biofilmovi nakon tretmana promatrani su konfokalnim laserskim mikroskopom te je određen broj CFU/mL uzorka. Nakon primjene tretmana utvrđeno je da je došlo do $4,1 \log_{10}$ smanjenja CFU/mL kod biofilмова WT bakterija te $3,9 \log_{10}$ smanjenja CFU/mL kod biofilмова mutiranog soja *P. aeruginosa*. U supernatantu prikupljenom iz WT uzoraka ostvareno je $4,5 \log_{10}$ smanjenje CFU/mL, a kod mutiranog soja $4,1 \log_{10}$ smanjenje CFU/mL. Mikroskopskom analizom utvrđeno je i da je došlo do značajnog raspadanja biofilмова WT soja nakon tretmana te da je tek mali dio bakterija ostao vezan za površinu stakalca, dok kod mutiranog soja nije došlo do značajnijeg odvajanja dijelova biofilma. (42)

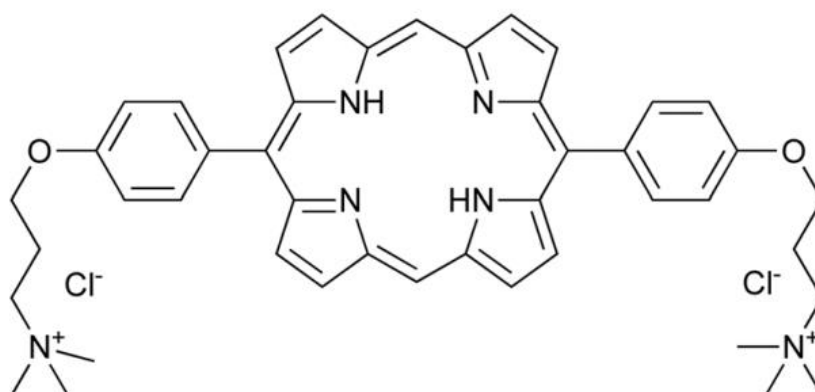
Posljednja od navedenih studija provedena je na biofilmovima gljivice *C. albicans*. Biofilmovi su inkubirani s otopinama TMPyP-a različite koncentracije u rasponu 0-50 μM u trajanju od 4 sata. Potom su osvjetljeni izvorom nekoherentne svjetlosti (valne duljine 418 ± 20 nm) u trajanju od 60 minuta te je doza svjetlosti iznosila $48,2$ J/cm². Vijabilnost stanica biofilma nakon tretmana utvrđena je CFU esejem. Utvrđeno je da je do značajne inaktivacije došlo tek pri koncentraciji 50 μM TMPyP-a, pri kojoj je postignuto 5 log₁₀ smanje broja CFU/mL, no koja je također uzrokovala toksičnost u mraku. (43)

Iz navedenih istraživanja vidljivo je da mnogo faktora utječe na efikasnost PDI mikroorganizama. Rezultati su pokazali da su biofilmovi Gr+ bakterije *S. aureus* podložni PDI posredovanoj TMPyP-om, ali u nedovoljnoj mjeri da bi došlo do baktericidnog učinka. Smanjenje broja CFU/mL značajno je manje kod primjene PDI posredovane TMPyP-om na biofilmovima nego što je to kod planktonskih organizama (za koje je postignuto i do 6 log₁₀ smanjenje broja CFU/mL), a obzirom na rezultate dobivene mikroskopskom analizom, autori sugeriraju da je manja efikasnost na biofilmovima *S. aureus* u odnosu na planktonske bakterije uzrokovana zbog razlika u građi stanične stijenke bakterija u biofilmu u odnosu na planktonske bakterije, razlika u brzini rasta te prisutnosti EPS-a. (24) S druge strane, TMPyP pokazao se kao potpuno neefikasan PS u inaktivaciji Gr+ *E. faecalis*. Pretpostavka autora je da TMPyP, zbog svoje relativno velike molekulske strukture, iz steričkih razloga nije mogao prodrijeti u biofilm *E. faecalis*. Vjerojatno je došlo do jakih elektrostatskih interakcija između ovog tetrakationskog PS-a i negativno nabijenih molekula EPS-a biofilma, što je moglo usporiti difuziju PS-a u biofilm. (41) Kod biofilmova oba soja *P. aeruginosa* bile su potrebne vrlo visoke koncentracije TMPyP-a kako bi se postigao baktericidni učinak, ali unatoč tome TMPyP se pokazao kao efikasan kationski PS u PDI biofilmova ove Gr- bakterije. Obzirom da TMPyP interkalira s DNA, pretpostavljeno je da je razlog kidanje dijelova biofilma nakon tretmana kod biofilmova WT soja *P.*

aeruginosa, koje je izostalo kod mutiranog soja, u povećanom udjelu vanstaničnog DNA u matrici biofilma WT soja bakterije. (42) TMPyP je također efikasno inaktivirao biofilmove gljivice *C. albicans*, ali ponovno tek pri višoj koncentraciji i uz dugi period inkubacije, što bi otežavalo njegovu primjenu *in vivo* kod liječenja gljivičnih infekcija. (43) Takvi rezultati pokazuju da je potreban individualan pristup pri odabiru PS-a za različite vrste bakterije, obzirom na svojstva i razlike u staničnoj morfologiji bakterija i arhitekturi biofilmova koje oni tvore.

4.2.4. 5,15-bis-[4-(3-trimetilamoniopropiloksi)fenil] porfirin diklorid (XF-73)

5,15-bis-[4-(3-trimetilamoniopropiloksi)fenil] porfirin diklorid, poznat i pod imenom XF-73, je sintetički dikationski derivat porfirina, a njegova struktura prikazana je na slici 7. U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da XF-73 djeluje baktericidno na niz Gr⁺ bakterija, uključujući *S. aureus* te je trenutno u fazi kliničkih ispitivanja za primjenu kod dekolonizacije nazalnih prijenosnika *S. aureus*. Svoje baktericidno djelovanje ostvaruje tako što narušava strukturu stanične stijenke bakterija. Obzirom na njegovu porfirinsku strukturu postoji mogućnost primjene i u PDI mikroorganizama koja je do sada slabo istražena, a njegova primjena u inaktivaciji mikroorganizama u biofilmu je ispitana na biofilmovima gljivice *C. albicans*. (43)



Slika 7: Kemijska struktura porfirina XF-73. (44)

Biofilmovi *C. albicans* inkubirani su sa otopinama XF-7-a različitih koncentracija u rasponu 0-10 μM u trajanju od 4 sata te su potom osvjetljeni izvorom nekoherentne svjetlosti (svjetlost valne duljine 418 ± 20 nm) 60 minuta. Doza svjetlosti iznosila je $48,2 \text{ J/cm}^2$. Nakon tretmana proveden je CFU esej kako bi se utvrdila vijabilnost stanica. Njime je utvrđeno da je XF-73 već pri koncentraciji od $1 \mu\text{M}$ postigao $5 \log_{10}$ smanjenje broja CFU/mL. Kako bi utvrdili uzrokuje li EPS povećanu otpornost stanica gljivica u biofilmu u odnosu na planktonske, tretman je

proveden i na stanicama disperziranim iz zrelog biofilma. Stanice su sastrugane sa biofilma i resuspendirane s PBS-om. Zatim su sonificirane u ultrazvučnoj kupelji i protresene na Vortex mješalici kako bi se dobila suspenzija pojedinačnih stanica koje su izgubile većinu EPS-a. Stanice su inkubirane s XF-73 u rasponu koncentracija 0-10 μM u trajanju od 15 minuta te su osvijetljene istim izvorom svjetlosti kao i stanice u biofilmu, ali je doza svjetlosti bila manja, a iznosila 12,1 J/cm². CFU esejem je pokazano da je XF-73 pri koncentraciji od samo 0,1 μM uzrokovao 5 log₁₀ smanjenje broja CFU/mL kod stanica disperziranih iz biofilma. (43)

Ovim istraživanjem pokazano je da eksperimentalni PS XF-73 već pri vrlo niskim koncentracijama postiže jak antimikrobni učinak protiv biofilma *C. albicans*. Tim istraživača je također pokazao da su stanice disperzirane iz biofilma mnogo podložnije PDI posredovanoj XF-73-om jer se jednak antifungalni učinak kao i kod stanica biofilma postiže pri mnogo nižim koncentracijama PS-a, manjim vremenom inkubacije i manjom dozom svjetlosti. Time su pokazali da je uzrok povećane otpornosti stanica u biofilmu prisutnost EPS-a. Obzirom na obećavajuće rezultate ovog istraživanja, potrebno je provesti daljnja ispitivanja i razmotriti njegovu primjenu u liječenju gljivičnih infekcija.

5. Zaključak

Uporaba porfirina kao fotosenzibilizatora za fotodinamičku inaktivaciju mikroorganizama u biofilmovima za sada pokazuje obećavajuće rezultate. Svi bakterijski i gljivični biofilmovi iz spomenutih istraživanja, osim biofilma *E. faecalis*, pokazali su podložnost prema fotodinamičkoj inaktivaciji posredovanoj neutralnim i kationskim porfirinima te endogenim protoporfirinom IX, no nije kod svih postignut baktericidan učinak. Porfimer natrij dao je pozitivne rezultate, ali nije ih moguće kvalitetno usporediti zbog razlika u metodologiji korištenoj u istraživanjima. Primjena 5-aminolevulinske kiseline kao prekursora endogenog fotosenzibilizatora protoporfirina IX pokazala se kao zanimljiv pristup. Međutim, ispostavilo se da je uporaba lipofilnijih derivata, poput metil aminolevulinata, bolji odabir za inaktivaciju bakterijskih biofilma. Tetrakationski TMPyP u određenoj je mjeri uzrokovao inaktivaciju, ali unatoč dobrim rezultatima na planktonskim bakterijama, nije se pokazao kao najbolje rješenje za primjenu na biofilmovima zbog slabe difuzije u dublje slojeve biofilma uzrokovane jakim elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenom matricom biofilma. Zbog navedenih interakcija potrebno je razmotriti primjenu fotosenzibilizatora s manje pozitivno nabijenih skupina, koji bi i dalje bili kationskog karaktera, ali bi lakše difundirali u biofilm. Dikationski spoj XF-73 pokazao se efikasan u fotodinamičkoj inaktivaciji biofilmovima *C. albicans*, no potrebno je razmotriti njegovu efikasnost na bakterijskim biofilmovima. Ovaj spoj ima dokazano baktericidno djelovanje koje ostvaruje narušavajući strukturu stanične stijenke bakterija. Fotoaktivacijom XF-73 mogao bi se postići dvojni efekt inaktivacije bakterija u biofilmu, no potrebno je provesti daljnja istraživanja. Ipak, radi se o vrlo obećavajućem spoju i svakako ga je potrebno ozbiljno razmotriti.

Primjena porfirinskih fotosenzibilizatora u fotodinamičkoj inaktivaciji mikroorganizama u biofilmu je, unatoč pozitivnim rezultatima dobivenima u dosadašnjim istraživanjima, još daleko od široke uporabe. Trenutna nesuglasnost u protokolima i esejima kojima se ispituje antimikrobna

aktivnost na biofilmovima otežava kvalitetnu usporedbu efikasnosti ispitivanih fotosenzibilizatora i napredak u ovom polju. Kako bi se fotodinamička inaktivacija uopće mogla ozbiljno razmotriti kao način suzbijanja biofilмова, potrebno je uskladiti metodologiju i standardizirati protokole koji se koriste u istraživanjima. Također je potrebno uzeti u obzir da su *in vivo* biofilmovi rijetko građeni od samo jedne bakterijske ili gljivične vrste, kao što su biofilmovi u navedenim istraživanjima. To čini situaciju mnogo kompleksnijom i stoga je potrebno spojeve ispitivati na složenijim biofilmovima za dobivanje relevantnijih rezultata.

6. Literatura

1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* **2002** Apr;15(2):167–93.
2. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* **2015**;10(11):1743–50.
3. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* **2015** Apr;3(2):MB-0001-2014.
4. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis.* **2002** Sep;8(9):881–90.
5. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2018** Jan;16(1):51–65.
6. Almeida A, Faustino MAF, Tomé JPC. Photodynamic inactivation of bacteria: finding the effective targets. *Future Med Chem.* **2015**;7(10):1221–4.
7. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* **2016** Feb 15;473(4):347–64.
8. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* **2009** Mar;24(2):259–68.
9. Liu Y, Qin R, Zaat S, 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** Dec 1;1:140–67.
10. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* **2013** Jan;46(1):7–23.
11. Hu X, Huang Y-Y, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy to Control Clinically Relevant Biofilm Infections. *Front Microbiol.* **2018**;9:1299.
12. de Melo WC, Avci P, de Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2013** Jul;11(7):669–93.
13. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* **2014**;5:405.
14. Wainwright M, Crossley KB. Photosensitising agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **2004** Mar 1;53(2):119–26.

15. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. **2004** May;3(5):436–50.
16. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **2010** May;2(5):a000414.
17. Pereira MA, Faustino M a. F, Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro J a. S, et al. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol Sci*. **2014** Apr;13(4):680–90.
18. Kashef N, Huang Y-Y, Hamblin MR. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. *Nanophotonics*. **2017** Aug;6(5):853–79.
19. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*. **2006** Aug;28(8):799–808.
20. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res*. **2008**;163(1):1–12.
21. Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med*. **2012** Sep;44(7):588–96.
22. Luke-Marshall NR, Mang TS, Hansen LA, Campagnari AA. *Moraxella catarrhalis* is susceptible to antimicrobial photodynamic therapy with Photofrin. *Lasers Surg Med*. **2014** Nov;46(9):712–7.
23. Chabrier-Roselló Y, Foster TH, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* Germ Tubes and Biofilms to Photofrin-Mediated Phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005** Oct 1;49(10):4288–95.
24. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. **2009** Jun;30(18):3158–66.
25. Buchovec I, Paskeviciute E, Luksiene Z. Photosensitization-based inactivation of food pathogen *Listeria monocytogenes* in vitro and on the surface of packaging material. *J Photochem Photobiol B, Biol*. **2010** Apr 2;99(1):9–14.
26. Almeida A, Cunha A, Faustino M a. F, Tomé AC, Neves MGPMS. Chapter 5: Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. In: *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens*. **2011**. p. 83–160.
27. Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. *Met Based Drugs*. **2008**;2008.


28. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg.* **1991** May;61(5):340–8.
29. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, et al. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* **2002** Mar;2(2):187–207.
30. Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. *Oncotarget.* **2017** Aug 11;8(46):81591–603.
31. Alves E, Costa L, Carvalho CMB, Tomé JPC, Faustino MA, Neves MGPM, et al. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* **2009** Apr 15;9:70.
32. Malatesti N, Munitic I, Jurak I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys Rev.* **2017** Apr;9(2):149–68.
33. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* **2006** Jun;38(5):468–81.
34. Ormond AB, Freeman HS. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials (Basel).* **2013** Mar 6;6(3):817–40.
35. Bolze F, Jenni S, Sour A, Heitz V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. *Chem Commun (Camb).* **2017** Nov 30;53(96):12857–77.
36. Sachar M, Anderson KE, Ma X. Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. *J Pharmacol Exp Ther.* **2016** Feb;356(2):267–75.
37. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B, Biol.* **1990** Jun;6(1–2):143–8.
38. Zhang Q-Z, Zhao K-Q, Wu Y, Li X-H, Yang C, Guo L-M, et al. 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its strain-dependent combined effect with antibiotics on *Staphylococcus aureus* biofilm. *PLoS ONE.* **2017**;12(3):e0174627.
39. Liu C, Zhou Y, Wang L, Han L, Lei J, Ishaq HM, et al. Photodynamic inactivation of *Klebsiella pneumoniae* biofilms and planktonic cells by 5-aminolevulinic acid and 5-aminolevulinic acid methyl ester. *Lasers Med Sci.* **2016** Apr;31(3):557–65.
40. Plaunt AJ, Harmatys KM, Hendrie KA, Musso AJ, Smith BD. Chemically triggered release of 5-aminolevulinic acid from liposomes. *RSC Adv.* **2014** Oct 29;4(101):57983–90.

41. Cieplik F, Späth A, Regensburger J, Gollmer A, Tabenski L, Hiller K-A, et al. Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR--an exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic Biol Med.* **2013** Dec;65:477–87.
42. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The effect of a cationic porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol.* **2010** Nov;61(5):411–6.
43. Gonzales FP, Felgenträger A, Bäuml W, Maisch T. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol.* **2013** Jun;8(6):785–97.
44. Butler MS, Robertson AAB, Cooper MA. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep.* **2014** Nov;31(11):1612–61.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Neli Malatesti na pruženim savjetima i smjernicama, kao i na danoj prilici za pisanje ovog završnog rada.

OSOBNJE INFORMACIJE Vedrana Krušić

 Braće Hlača 5, 51000 Rijeka (Hrvatska)

 +385 917520409

 vedrana.krusic@gmail.com

Datum rođenja 23. siječnja 1997.

RADNO ISKUSTVO

2018 **Demonstrator na kolegiju "Bioaktivne komponente mediteranske prehrane"**
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

06/2017–07/2017 **Promotorica**
DEKRA za privremeno zapošljavanje d.o.o., Rijeka (Hrvatska)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2015–danas **Student**
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)
-dobitnica stipendije za izvrsnost Sveučilišta u Rijeci

2011–2015
Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka, Rijeka (Hrvatska)
-prirodoslovno-matematički smjer

2003–2011
Osnovna škola "Fran Franković", Rijeka (Hrvatska)

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Strani jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C1	C1	B2	B2	B2
njemački	A2	A2	A1	A1	A2

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA

Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

[Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu](#)

- vješto korištenje Windows Office osnovnim programima (Word, Excell, PowerPoint...)
- poznavanje rada u kemijskim programima Avogadro, Marvin Sketch, Chimera, PyMOL, Gamess
- pretraživanje baza podataka kao što je Protein Data Bank (PDB)

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Članstva Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci

Volontiranje -projekt Putujući znanstvenici
-otvoreni dan Odjela za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci (2018.)