

FOTODINAMIČKI UČINAK PORFIRINA NA LEGIONELE

**Ivona Viduka, univ. bacc.
biotech. et. pharm. inv.**
Sveučilište u Rijeci,
Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka
ivona.viduka@gmail.com

Gabrijela Begić, mag. med. lab. diag.
Sveučilište u Rijeci,
Medicinski fakultet,
Zavod za mikrobiologiju
i parazitologiju
Ulica braće Branchetta 20/1,
51000 Rijeka

izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti
Sveučilište u Rijeci,
Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka

izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin
Sveučilište u Rijeci,
Medicinski fakultet,
Zavod za mikrobiologiju
i parazitologiju
Ulica braće Branchetta 20/1,
51000 Rijeka

Legionella pneumophila je gram-negativna bakterija čije je prirodno stanište voda, uključujući rijeke, jezera i potoke. *L. pneumophila* je uzročnik pontiačke groznice i legionarske bolesti, a kontaminirani distribucijski sustavi za vodu i ovlaživači zraka samo su neki od izvora infekcije. Unatoč provođenju protuepidemijskih mjera, sve je češća pojava legioneloza, stoga je potrebno razviti nove metode za uklanjanje legionele iz vode. Jedan od pristupa je protumikrobna fotodinamička terapija koja uključuje zajedničko djelovanje fotosenzibilizatora, molekularnog kisika i vidljivog svjetla određene valne duljine u svrhu produkcije singletnog kisika i kisikovih reaktivnih vrsta koji ubijaju mikrobnu stanicu. U ovom su radu određivane minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije različitih porfirina na *L. pneumophila* u bujonu dilucijskom metodom. Korišteno je crveno svjetlo ukupne doze 24 J cm^{-2} , a osvjetljavanje je trajalo 10 minuta. Najjači antibakterijski učinak utvrđen je kod amfipatskog porfirina i potrebna su daljnja istraživanja o djelotvornosti ovih spojeva i primjene fotodinamičke terapije u inaktivaciji legionele u vodi.

Ključne riječi: amfipatski porfirin, protumikrobna fotodinamička terapija, *Legionella pneumophila*

1. UVOD

Legionella pneumophila je okolišna bakterija iz porodice *Legionellaceae* (Edelstein i Cianciotto, 2006.). Prirodno stanište legionele je voda, a može biti pronađena u rijekama, jezerima i potocima. Najčešći vodeni izvori infekcije su distribucijski sustavi za pitku vodu, rashladni tornjevi, ovlaživači zraka i termalni izvori (Rakić et al., 2013.; Rathore et al., 2018.). Dekontaminacijom inficiranog vodenog izvora se može izbjeći zaraza legionelom, ali to su vrlo skupe metode. Najčešći načini uklanjanja legionele su periodična pregrijavanje vode i kontinuirano kloriranje. Međutim, unatoč provođenju protuepidemijskih mjera, sve je češća pojavnost legioneloza svugdje u svijetu. Na području Europske unije i Europskog gospodarskog prostora, 2012. godine na 100 000 stanovnika stopa legionarske bolesti

iznosila je 1,2 (5 848 zabilježenih slučajeva), dok je 2016. godine stopa porasla na 1,4 (7 069 zabilježenih slučajeva) (ECDC, 2018.). Zbog toga je potrebno razviti nove metode uklanjanja legionele iz primarnog izvora zaraze, vode. Jedna od potencijalnih metoda je fotodinamička terapija. Protumikrobna fotodinamička terapija (aPDT skraćeno od *engl.* – antimicrobial photodynamic therapy), poznata kao i fotodinamička inaktivacija (PDI skraćeno od *engl.* – photodynamic inactivation), je minimalno invazivna protumikrobna terapija predstavljena kao alternativni pristup u liječenju lokaliziranih infekcija i pročišćavanju vode (Rosa et al., 2014.; de Melo et al., 2013.).

PDT uključuje zajedničko djelovanje fotosenzibilizatora (PS skraćeno od *engl.* – photosensitizer), molekularnog kisika i vidljivog svjetla određene valne duljine u svr-

hu produkcije singletnog kisika (1O_2) i kisikovih reaktivnih vrsta (ROS skraćeno od *engl.* – reactive oxygen species), što vodi do oksidacije brojnih staničnih komponenti i brze stanične inaktivacije (de Melo et al., 2013.). Jedna od prednosti PDT-a, u usporedbi s principom antibiotika (ključ-brava) je stvaranje 1O_2 i ROS-a na više mjesta u bakteriji (*engl.* multitarget proces) (de Melo et al., 2013.; Maisch, 2015.). Neke bakterije imaju adaptivni odgovor kao što je uklanjanje vodikovog peroksida, ali ovi mehanizmi najčešće nisu dovoljni za savladavanje oksidativnog stresa produciranog s aPDT (Maisch, 2015.).

1.1. Mehanizam fotodinamičke terapije

Za fotodinamičku terapiju potreban je PS, izvor svjetla i molekularni kisik (Rosa et al., 2014.). PS ima stabilnu elektronsku konfiguraciju u najnižem osnovnom energetskom stanju (S_0) (Rosa et al., 2014.; Nyman et al., 2004.). Apsorpcijom svjetla odgovarajuće valne duljine, PS prelazi iz osnovnog nepobuđenog stanja u kratkotrajno pobuđeno singletno stanje $^1PS^*$ (S_1, S_2, \dots, S_n). PS se može vratiti u S_0 stanje unutarnjom pretvorbom i otpuštanjem fluorescencije. Međutim, $^1PS^*$ može prijeći u pobuđeno triplet stanje ($^3PS^*$) međusustavnim prijelazom (*engl.* intersystem crossing). Ovaj prijelaz je spinski zabranjen, ali dobri PS-i su oni koji učinkovito stvaraju tripletna stanja (Nyman et al., 2004.). $^3PS^*$ ima dovoljno dug poluživot za stupanje u kemijske reakcije i to putem dva mehanizma (de Melo et al., 2013.). Mehanizam tipa I uključuje reakcije prijenosa elektrona između $^3PS^*$ i molekularnog supstrata, što rezultira stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta kao što su: superoksid, vodikov peroksid i hidroksil radikali (de Melo et al., 2013.; Rossi et al., 2012.). Kod mehanizma tipa II dolazi do prijenosa energije s $^3PS^*$ na molekularni kisik (3O_2) i posljedično stvaranje pobuđenog singlet kisika (1O_2), dok se PS vraća u S_0 stanje (de Melo et al., 2013.; Nyman et al., 2004.; Rossi et al., 2012.). 1O_2 je jaki oksidans kada se usporedi s osnovnim triplet kisikom (3O_2) i smatra se da najviše pridonosi oštećenju stanice i staničnoj smrti (de Melo et al., 2013.; Malatesti et al., 2016.). Singletni kisik uzrokuje smanjenje produkcije ATP-a i oštećenje DNA (Bhatti et al., 1998.). Ove se reakcije mogu odvijati u isto vrijeme, ali njihov omjer zastupljenosti ovisi o strukturi PS-a i mikrookolišu (de Melo et al., 2013.).

1.2. Fotosenzibilizatori

PS su planarne, nezasićene organske molekule, elektronski delokalizirane, što doprinosi njihovoj obojenosti. Akridin narančasta bio je prvi PS upotrijebljen za mikrobnu fotoinaktivaciju. Do sada korišteni PS-i u terapiji raka i drugim tkivnim bolestima temelje se na tetrapirolnoj jezgri, a ponajviše su to porfirini i njima srodni spojevi. Uz porfirine, i drugi tetrapiroli kao klorini, bakterioklorini i ftalocijanini predstavljeni su kao moćni protumikrobni PS-i (de Melo et al., 2013.). Idealni PS treba biti nisko toksičan, kada nije aktiviran svjetlom, čistog sastava, topljiv u vodi ili smjesi nekog otapala s

vodom te proizvoditi visoku količinu 1O_2 i ROS u kratkom vremenu osvjetljavanja (Rosa et al., 2014.). Interakcija između PS-a i stanice se može poboljšati povećanjem lipofilnosti, što olakšava prodiranje kroz staničnu membranu (Orlandi et al., 2013.).

1.3. Porfirini

Porfirini su razred aromatskih heterocikličkih spojeva koji su prisutni u prirodi. Sudjeluju u biokemijskim procesima kao što su transport kisika (hem) i fotosinteza (klorofil). Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava trenutno se koriste u više područja uključujući i fotodinamičku inaktivaciju (Almeida et al., 2011.). Osim toga, imaju sposobnost fluorescencije zbog čega se mogu koristiti u dijagnostičke svrhe s potencijalnom primjenom u teranostici (Malatesti et al., 2017.). Istraživanja su pokazala da naboj porfirina utječe na protumikrobnu djelotvornost. Porfirini s 3 ili 4 pozitivna naboja pokazali su veću učinkovitost u inaktivaciji bakterija *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis*. Također, PS molekule s 2 naboja u susjednim pozicijama su učinkovitije od onih s nabojima u suprotnim položajima. Naboji u susjednim pozicijama doprinose molekularnoj distorziji zbog elektrostatskog odbijanja (Alves et al., 2009.).

1.4. Fotodinamička inaktivacija i protumikrobno djelovanje

Razlika u građi između Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija uzrokuje različitu podložnost na PDT (de Melo et al., 2013.). Gram-pozitivne bakterije imaju staničnu stijenku sastavljenu od peptidoglikanskih slojeva, usko povezanih s lipoteihoičnom i negativno nabijenom teihonskom kiselinom, što pridonosi poroznosti. Makromolekule od 30 000 do 60 000 Da mogu difundirati prema citoplazmatskoj membrani koja nije daljnja barijera za većinu PS-a (molekularna težina ne prelazi 1 500 – 1 800 Da). Gram-negativne bakterije sadrže dodatnu vanjsku membranu, smještenu izvan peptidoglikanskog sloja. Vanjska membrana se sastoji od asimetričnih struktura kao što su: negativno nabijeni lipopolisaharidi (LPS), fosfolipidi, lipoproteini i proteini u funkciji porina (Pereira et al., 2014.). Tako visoko organizirana struktura ne propušta mnogo molekula i povećava rezistenciju, ali hidrofilne molekule od 600 do 700 Da mogu difundirati kroz porinski kanal (de Melo et al., 2013.; Pereira et al., 2014.). Neutralni i anionski PS mogu učinkovito uništiti Gram-pozitivne bakterije, ali nisu djelotvorni protiv Gram-negativnih bakterija (Alves et al., 2009.). Njihova učinkovitost protiv Gram-negativnih bakterija može se postići kombiniranjem s drugim tvarima koje oštećuju membranu kao što su $CaCl_2$, Tris-EDTA i nonapeptidni polimiksin B (de Melo et al., 2013.; Alves et al., 2009.). Direktna inaktivacija Gram-negativnih bakterija se može postići korištenjem kationskih PS-a koji se trenutno istražuju u PDT-u i kao potencijalni antimalarici (Pereira et al., 2014.; Stallivieri et al., 2015.).

Glavne mete kod bakterija su vanjske strukture, citoplazmatska membrana i stanični zid, a manje nukleinske kiseline. Oštećenje vanjske mikrobne strukture dovodi do izljeva staničnog sadržaja ili inaktivacije membranskog transportnog sustava i enzima. Vjerojatnost rezistencije je minimalna, jer bi organizmi trebali razviti posebne mehanizme za blokiranje unosa antimikrobnog agensa, povećano izlučivanje spoja te povećanje metaboličke detoksikacije. O važnosti peptidoglikanskih spojeva nam govori i studija koja je pokazala da su tri soja Gram-pozitivnih bakterija s višeslojnim staničnim zidom slično ili manje inaktivirane nego Gram-pozitivne bakterije s tipičnim jednoslojnim staničnim zidom (Alves et al., 2009.).

1.5. Izvor svjetlosti

Izvor i doza svjetla su vrlo važni parametri koji utječu na učinkovitost PDT-a. Svjetlost određene valne duljine je nužna za fotoinaktivaciju mikroorganizama, a valna duljina ovisi o strukturi i apsorpcijskom spektru elektrona PS-a (Almeida et al., 2011.). Zbog visoke konjugiranosti porfirini imaju karakteristični UV-VIS spektar (*engl.* ultra-violet visible spectrum). Spektar se sastoji od intenzivne, uske apsorpcijske vrpce između 400 i 430 nm u plavom području spektra, poznatije kao Soret vrpca (*engl.* Soret band) te 4 slabije apsorpcijske vrpce između 450 i 700 nm naziva Q vrpce u crvenom području (*engl.* Q bands) (Josefsen et al., 2008.). Iako su Q vrpce manje od Soret vrpce, valne duljine u području Q vrpce (crveno svjetlo) bolje prodiru u tkiva, dok su valne duljine Soret vrpce djelotvornije u vodi (Almeida et al., 2011.).

1.6. Primjena fotodinamičke inaktivacije

Antimikrobna PDT klinički se može primijeniti kod lokaliziranih virusnih infekcija uzrokovanih herpesvirusima i papilomavirusima i kod nevirusnih dermatoloških infekcija kao što su akne i ostale infekcije uzrokovane kvascima, gljivama i bakterijama (Kharkwal et al., 2011.). Upotreba PDT-a je dobro istražena u dentalnoj medicini za liječenje parodontitisa i endodonticiji (Jori et al., 2006.). Trenutno se proučava dekontaminacija krvi pomoću PDT-a kao metoda sterilizacije za pripremu koncentrata crvenih krvnih stanica.

Ubrzana industrijalizacija, rast populacije i nestašica vode uzrokovali su povećanu potražnju čiste vode. Kao alternativa tradicionalnoj dezinfekciji vode (kloriranje, ozonoliza, UV zračenje), fotooksidacijski procesi su obećavajuća tehnologija s niskim troškovima, slabim utjecajem na okoliš i jednostavnim upravljanjem. Prolazeći kroz vodu, spektar i intenzitet bijelog svjetla se mijenja, jer se voda ponaša kao filter, te valna duljina plavog svjetla (450 - 495 nm) najjače prodire (Rossi et al., 2012.). Pročišćavanje zagađene vode korištenjem solarnog zračenja u prisutnosti PS-a i otopljenog kisika dovodi do razgradnje pesticida i smrti mikroorganizama. Jedino ograničenje ove metode je potreba za uklanjanjem

otopljenog PS-a iz vode (de Melo et al., 2013.). Nadalje, pokazalo se da SbTPP/b-SiO₂ kao katalizator djeluje učinkovito na smanjenje koncentracije legionele ozračivanjem pod vidljivim svjetlom u životom okolišu (Fueda et al., 2005.).

1.7. *Legionella pneumophila*

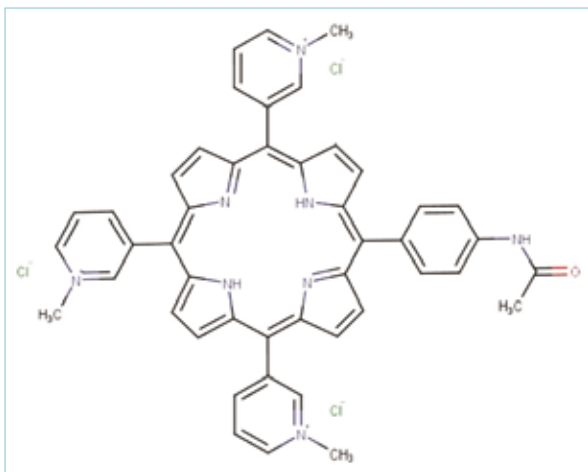
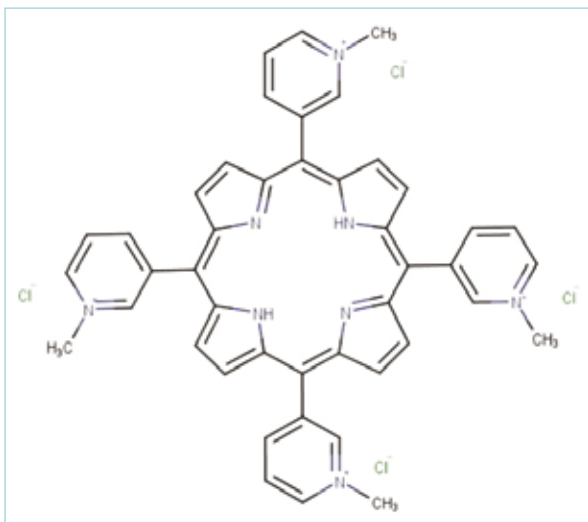
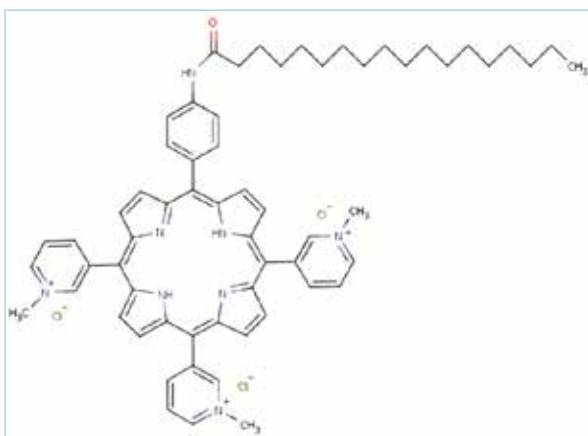
U okolišu su prisutne bakterije iz porodice *Legionellaceae*, a u vodenom ekosustavu se prirodno nalaze bakterije roda *Legionella* spp., unutar kojeg je danas poznato više od 60 vrsta, od kojih je *Legionella pneumophila* najčešći uzročnik bolesti koje se prenose vodom (Edelstein i Cianciotto, 2006.; Khodr et al., 2016.). Poznato je 14 seroskupina bakterije *L. pneumophila*, a iako je otkriveno više od 70 serogrupa, *L. pneumophila* serogrupe I je glavni uzročnik legioneloza (Edelstein i Cianciotto, 2006.; Rathore, 2018.).

Infekcija legionelom započinje udisanjem aerosola kontaminiranog legionelom. Neki od sustava koji su povezani s prijenosom legionele su: rashladni tornjevi, ovlaživači, dišna terapijska oprema i prijenosni distribucijski sustavi vode (npr. tuš) (Rathore, 2018.). Termin 'legioneloza' se koristi za infekcije uzrokovane bakterijom *L. pneumophila*. Težina infekcija varira od blage, respiratorne bolesti (pontiačka groznica) do brze i potencijalno fatalne upale pluća (legionarska bolest) (World Health Organization, 2007.).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Spojevi

Za potrebe ovoga rada korištena su 3 spoja, točnije 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris (*N*-metilpiridin-3-il) porfirin klorid (TMPyP3-CH₃) čija je struktura prikazana na slici 1; 5,10,15,20-tetrakis (*N*-metilpiridin-3-il) porfirin tetraklorid (TMPyP3) prikazan na slici 2; 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tri (*N*-metilpiridin-3-il)porfirin klorid (TMPyP3-C₁₇H₃₅) prikazan na slici 3. Navedeni porfirini sintetizirani su u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja na Odjelu za biotehnologiju u Rijeci; spojevi TMPyP3-C₁₇H₃₅ i TMPyP3-CH₃ opisani su u radu (Malatesti et al., 2016.), dok je spoj TMPyP3 poznat od ranije (Dutikova et al., 2010.). Svi navedeni porfirini su kationski (s tri ili četiri pozitivna naboja), ali TMPyP3-CH₃ i TMPyP3 su hidrofilni, dok je TMPyP3-C₁₇H₃₅ amfipatski s dugačkim lipofilnim lancem. Napravljene su koncentrirane (*stock*) otopine spojeva u PBS-u (skraćeno od *engl.* - phosphate buffered saline), koncentracije 200 μM. Kroz sterilni mikrofiltrar, čije su pore promjera 0,45 μm, *stock* otopine su sterilizirane i čuvane u hladnjaku pri temperaturi od +4°C u zatamnjenoj staklenoj ambalaži koja je dodatno prekrivena aluminijskom folijom radi smanjenja utjecaja svjetla. Mikrotitarske pločice i epruvete sa spojevima su tijekom izvođenja testova također bile zaštićene aluminijskom folijom.

Slika 1: Kemijska struktura hidrofilnog porfirina **TMPyP3-CH₃**Slika 2: Kemijska struktura hidrofilnog porfirina **TMPyP3**Slika 3: Kemijska struktura amfipatskog porfirina **TMPyP3-C₁₇H₃₅**

2.2. Bakterijski soj

U studiji je korišten klinički izolat bakterije *Legionella pneumophila* (soj 130b). Bakterija je suspendirana u

10 %-tnom glicerol bujonu (Biolife, Italy), alikvotirana i čuvana u zamrzivaču na -80°C . Prije korištenja u pokusu bakteriju je potrebno nasaditi na BCYE (skraćeno od *engl.* – Buffered Charocoal Yeast Extract) agar uz dodatak suplementa za rast legionele (*Legionella* growth supplement, Oxoid UK) te inkubirati na 37°C u atmosferi obogaćenoj CO_2 . Nakon 3 – 5 dana vidljiv je porast bakterijskih kolonija na podlozi.

2.3. Bakterijski inokulum

U epruvetu se dodalo oko 5 mL BYE bujona (Oxoid UK). Sterilnim brisnim štapićem su pokupljene kolonije legionele porasle na BCYE hranjivoj podlozi te su nacijepljene u BYE bujon i homogenizirane na mješalici. Nakon toga se broj bakterija odredio pomoću spektrofotometra, a optička gustoća (OD skraćeno od *engl.* – optical density) je podešena na OD1, što odgovara koncentraciji bakterija od 1×10^9 CFU/mL (*engl.* colony-forming unit). Bakterijska suspenzija se razrijedila s bujonom do 10^6 CFU/mL. To je ujedno i koncentracija koja se koristila u svim pokusima.

2.4. Ispitivanje protubakterijskog učinka različitih porfirina dilucijskom metodom

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) dilucijom su metode korištene za dokazivanje protubakterijske aktivnosti porfirina na legionelu u BYE bujonu. U mikrotitarske pločice nanesen je niz dvostrukih, serijskih razrjeđenja ispitivanog spoja u BYE bujonu te bakterijska suspenzija određene koncentracije (10^6 CFU/mL). Kao negativna kontrola korištena je bakterijska suspenzija u bujonu, bez spoja. Mikrotitarska pločica omotana aluminijskom folijom stavljena je u termostataranu tresilicu na inkubaciju pri 27°C , 30 minuta. Nakon polusatne inkubacije uslijedilo je osvjetljavanje mikrotitarske pločice u trajanju od 10 minuta. Istovremeno je rađen isti postupak u mikrotitarskoj pločici s medijem, spojem i bakterijskom suspenzijom, kao kontrola spoja bez aktivacije svjetlom.

Kao izvor svjetla korištena je lampa bazirana na LED (*engl.* light emitting diode) koja emitira crveno svjetlo protoka 40 mW/cm^2 , a ukupna doza svjetla kojem su izložene bakterije u jažicama mikrotitarske pločice nakon 10 minuta je 24 J/cm^2 .

Nakon osvjetljavanja pločice su inkubirane 48h na temperaturi 37°C . Zatim se nasadilo $10 \mu\text{L}$ uzorka iz svake jažice na BCYE hranjivu podlogu, koja se inkubirala na $37^{\circ}\text{C}/72$ sata. Nakon 72 sata očitani su rezultati. MIK vrijednost je najmanja koncentracija spoja kod koje nakon 72 sata dolazi do vidljivog sprječavanja rasta, odnosno proliferacije bakterija. MBK vrijednost je najmanja koncentracija spoja kod koje nema vidljivog porasta bakterija.

2.5. Fotoinaktivacijski test

Određivanje dinamike fotodinamičke terapije vršilo se fotoinaktivacijskim testom. Nakon pripreme bakterijske kulture u BYE bujonu i namještanja koncentracije bakterija (10^6 CFU/mL), pomiješano je 100 μ L pripremljene bakterijske suspenzije i 100 μ L ispitivanog spoja (koncentracije MIK i $\frac{1}{2}$ MIK-a). Bakterije i ispitivani spoj su inkubirani uz miješanje na sobnoj temperaturi u mraku kroz 20 minuta. Nakon toga slijedi izlaganje pod crvenom lampom protoka 40 mW/cm² tijekom 120 minuta. Kontrola nije sadržavala ispitivane spojeve, već samo bakterije. Broj bakterija je praćen nasadivanjem deseterostrukih razrjeđenja na BCYE agar u različitim vremenskim intervalima tijekom 120 minuta.

2.6 Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni računalnim programom za obradu podataka Excel. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost s naznačenom standardnom devijacijom kao mjerom varijabilnosti.

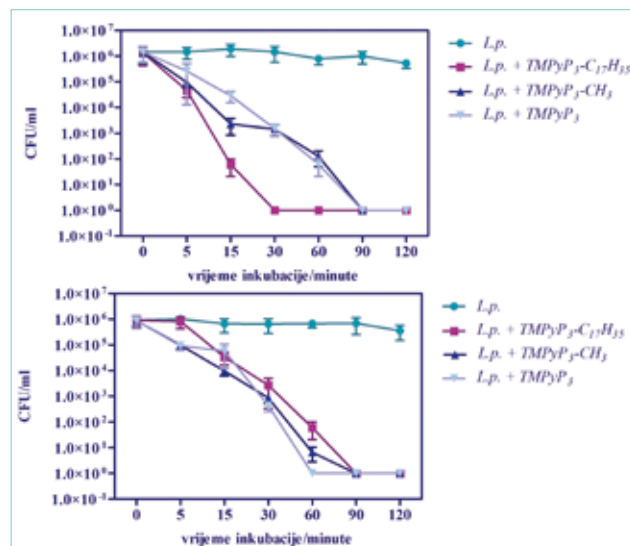
3. REZULTATI I DISKUSIJA

Vrijednosti MIK i MBK za sva tri ispitivana spoja i kontrole prikazane su u [tablici 1](#). Spojevi TMPyP3 i TMPyP3-CH₃ imali su iste MBK vrijednosti, 50 μ M, dok je inhibicija rasta legionele tretirane spojem TMPyP3-CH₃ uočena pri nižoj koncentraciji (25 μ M) u odnosu na spoj TMPyP3 (50 μ M). Minimalna razlika u aktivnosti tetrakationskog TMPyP3 i trikationskog TMPyP3-CH₃ porfirina mogla bi se pripisati različitom broju pozitivnih naboja.

Rezultati pokazuju da je najsnažniji antibakterijski učinak protiv Gram-negativne bakterije, *L. pneumophila* imao amfipatski porfirin TMPyP3-C₁₇H₃₅. Koncentracija ovog spoja, aktiviranog crvenim svjetlom, potrebna za inhibiciju i potpuno zaustavljanje rasta legionele u BYE bujonu znatno je niža u odnosu na druga dva spoja i iznosila je 3,125 μ M. Iako su sva tri PS-a kationska i stoga se pretpostavlja da stvaraju interakcije s negativno nabijenom vanjskom membranom Gram-negativnih bakterija, pretpostavili smo da će amfipatski porfirin

imati bolji učinak. Naime, poznato je od ranije da ovakvi spojevi manje agregiraju, lakše prolaze kroz fosfolipidni sloj membrane i stoga uzrokuju višu citotoksičnost (Pisarek et al., 2014.).

Dinamika djelovanja porfirina na legionele u BYE bujonu, tijekom izlaganja crvenom svjetlu, utvrđena je praćenjem broja kultivabilnih bakterija u vremenskom periodu od 120 minuta ([slika 4](#)). Koncentracije ispitivanih porfirina odgovarale su vrijednostima MIK ([slika 4a](#)) i $\frac{1}{2}$ MIK ([slika 4b](#)). Rezultati pokazuju da amfipatski porfirin TMPyP3-C₁₇H₃₅, koji se u prethodnom ispitivanju pokazao najdjelotvornijim u najkraćem vremenu dovodi do potpunog zaustavljanja rasta legionele u bujonu. To je 30 minuta kada se koriste MIK, odnosno 60 minuta za $\frac{1}{2}$ MIK vrijednosti spoja. Kod druga dva kationska porfirina, TMPyP3-CH₃ i TMPyP3 vidljiva je inhibicija porasta, ali do potpunog zaustavljanja rasta legionele dolazi nakon 90 minuta u oba slučaja. To je još jedna indikacija da povećanje amfifilnosti porfirina pospješuje prodor kroz bakterijsku membranu, a time i njegovu učinkovitost.



Slika 4: Brzina inaktivacije legionela u bujonu nakon izlaganja crvenom svjetlu. Rezultat je prikazan kao broj bakterija tijekom 120-minutnog izlaganja crvenom svjetlu protoka 40 mW cm⁻² i MIK vrijednosti (A) te $\frac{1}{2}$ MIK vrijednosti ispitivanih porfirina (B). Eksperimenti su ponovljeni dva puta u triplikatu, a prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama.

Tablica 1: Antibakterijski učinak porfirina na legionele u BYE bujonu izlagane 10 minuta pod crvenim svjetlom protoka 40 mW cm⁻²

Kratice spoja	Aktivacija crvenim svjetlom		Bez aktivacije svjetlom	
	MIK/ μ M	MBK/ μ M	MIK/ μ M	MBK/ μ M
TMPyP3	50	50	>100	>100
TMPyP3-CH ₃	25	50	>100	>100
TMPyP3-C ₁₇ H ₃₅	3,125	3,125	>100	>100
KONTROLA (<i>L. pneumophila</i>)	>100	>100	>100	>100

MIK: minimalna inhibitorna koncentracija; MBK: minimalna baktericidna koncentracija

Već nekoliko godina se provode ispitivanja antimikrobnog djelovanja različitih porfirina. Eksperimentalni rezultati u dosadašnjim istraživanjima potvrđuju da ukoliko se koristi isti mikroorganizam i isti PS, PDI ovisi o vrsti svjetla koja je korištena (Almeida et al., 2011.; Wilson et al., 2008.).

Za potpunu inaktivaciju bakterije *Vibrio fischeri* u akvaturnoj vodi kationskim meso-supstituiranim porfirinom, Tri-Py⁺-Me-PF koncentracije 20 μ M potrebno je izlaganje 27 minuta sunčevoj svjetlosti, protoka 40 mW cm⁻². Jednaki rezultati upotrebom bijelog svjetla bili su postignuti nakon 270 minuta osvjetljavanja (Alves et al., 2011.).

Svjetlo kraćih valnih duljina, kao što je plavo svjetlo (400 – 450 nm), bolje odgovara Soret-ovoj vrpici porfirina, međutim za PDT i aPDT se češće koristi aktivacija fotosenzibilizatora crvenim svjetlom, jer ono prodire dublje u tkivo i dovodi do manje štetnog utjecaja na eukariotske stanice, pa se zato može koristiti za različite tretmane. Vrsta tretmana, područje tretmana i specifična primjena ovise o tome koja vrsta svjetla i koje područje valne duljine će se koristiti (Almeida et al., 2011.).

Ljubičasto svjetlo je učinkovito u vodi jer prolazeći kroz vodu spektar i intenzitet svjetla se mijenja, budući da se voda ponaša kao filter, stoga svjetla određene valne duljine jače prodiru, kao npr. ljubičasto (380 – 450 nm) i plavo svjetlo (450 – 495 nm) (Rossi et al., 2012.).

U ovom je radu djelovanje sintetiziranih porfirina ispitano u svrhu utvrđivanja antibakterijskog djelovanja i mogućnosti njihovog korištenja u fotodinamičkoj inaktivaciji bakterije *L. pneumophila*. Osnovne tehnike za uklanjanje legionele su termička obrada vode na temperaturama višim od 50°C, ultraljubičasto zračenje te obrada klorom, ozonom ili klordioksidom (Bajtal, 2013.). Unatoč provođenju protuepidemijskih mjera i korištenju navedenih metoda, legioneloze se sve češće javljaju u svijetu, stoga je nužno koristiti nove pristupe. Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu nastavka

istraživanja u vidu korištenja istoimene metode i spojeva, ali u dezinfekciji vode, što bi uključilo primjenu ljubičastog ili plavog svjetla.

4. ZAKLJUČCI

Ispitivani porfirini pokazali su različito antibakterijsko djelovanje protiv Gram-negativne bakterije, *L. pneumophila*. Najdjelotvornijim se iskazao amfipatski porfirin TMPyP3-C₁₇H₃₅, jer ima niže MIK i MBK vrijednosti od druga dva hidrofilna porfirina.

U određivanju dinamike djelovanja porfirina, TMPyP3-C₁₇H₃₅ najbrže djeluje. Već nakon 30 minuta u bujonu korištenjem MIK vrijednosti inaktivirane su sve bakterije, a nakon 60 minuta upotrebom 1/2 MIK vrijednosti. S druge strane, korištenjem MIK i 1/2 MIK vrijednosti TMPyP3 i TMPyP3-CH₃ sve bakterije u bujonu su mrtve nakon 90 minuta.

Svi spojevi su u vodi pokazali antimikrobni potencijal, ali amfipatski TMPyP3-C₁₇H₃₅ pokazuje veći potencijal od ispitivanih hidrofilnih porfirina za primjenu u dezinfekciji vode, jer ima najsnažnije djelovanje nakon svjetlosne aktivacije. Potrebna su daljnja istraživanja djelotvornosti ovih spojeva i primjene PDT u inaktivaciji legionele u vodi, čime bi se doprinijelo unaprjeđenju protuepidemijskih mjera i suzbijanju pojave legioneloza. ■

LITERATURA

- Almeida A.; Cunha A.; Faustino M. A. F.; Tome A. C.; Neves M. G. P. M. S. (2011.): Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents, Chapter 5, iz knjige: *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, 11, 83-160.
- Alves E.; Costa L., Carvalho C. MB.; Tome J. PC.; Faustion M. A.; Neves M. GPMS.; Tome A. C.; Cavaleiro J. AS.; Cunha A.; Almeida A. (2009.): Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiology*, 70(9), 1-13.
- Alves E.; Faustino M. A. F.; Tome J. P. C.; Neves M. G. P. M. S.; Tome A. C.; Cavaleiro J. A. S.; Cunha A.; Gomes N. C. M.; Almeida A. (2011.): Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy in Aquaculture: Photoinactivation Studies of *Vibrio fischeri*, *PLoS One*, 6(6), 1-9.
- Bajtal H. (2013.): Učinkovita rješenja za zaštitu od legionela, dostupno na: <http://www.energetika-net.com/specijali/izdvajamo/ucinkovita-rjesenja-za-zastitu-od-legionela-16397>, pristupljeno: 15.6.2018.
- Bhatti M.; MacRobert A.; Meghji S.; Henderson B.; Wilson M. (1998.): A Study of the Uptake of Toluidine Blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the Mechanism of Lethal Photosensitization. *Photochemistry and Photobiology*, 68(3), 370-376.
- de Melo W. CMA.; Nobrega de Oliveira P.A.M.; Gupta A.; Vecchio D.; Sadasivam M.; Chandran R.; Huang Y.-Y.; Yin R.; Perussi L. R.; Tegos G. P.; Perussi J. R.; Dai T.; Hamblin M. R (2013.): Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(7), 669-693.
- Dutikova Y. V.; Borisova O. F.; Shchyolkina A. K.; Lin J.; Huang S.; Shtil A. A.; Kaluzhny D. N. (2010.): 5,10,15,20-Tetra-(N-methyl-3-pyridyl)porphyrin destabilizes the antiparallel telomeric quadruplex d(TTAGGG)₄. *Molecular Biology*, 44(5), 823-831.
- Edelstein P.H.; Ciancioto N.P. (2006.): Legionella Species and Legionnaires' Disease. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. *The Prokaryotes*, 6, 988 – 1033.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2018.): Legionnaires' disease. Annual epidemiological report for 2016, dostupno na: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report.pdf>, pristupljeno: 20.11.2018.

- Fueda Y.; Hashimoto M.; Nobuhara K.; Yokoi H.; Komiya Y.; Shiragami T.; Matsumoto J.; Kawano K.; Suzuki S.; Yasuda M. (2005.): Visible-Light Bactericidal Effect of Silica Gel-supported Porphyrinatoantimony (V) Catalyst on Legionella Species Occurring in the Living Environmental Fields. *Biocontrol Science*, 10(1-2), 55-60.
- Jori G.; Fabris C.; Soncin M.; Ferro S.; Coppellotti O.; Dei D.; Fantetti L.; Chiti G.; Roncucci G. (2006.): Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 468-481.
- Josefsen LB; Boyle RW (2008.): Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers, *Metal-Based Drugs*, 1-24.
- Kharkwal G. B.; Sharma S. K.; Huang Y.-Y.; Dai T.; Hamblin M. R. (2011.): Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(7), 755-767.
- Khodr A.; Kay E.; Gomez-Valero L.; Ginevra C.; Doublet P.; Buchrieser C.; Jarraud S. (2016.): Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of Legionella. *Infection, Genetics and Evolution*. 43, 108-122.
- Maisch T. (2015.): Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 14(8), 1518-1526.
- Malatesti N.; Harej A.; Kraljević Pavelić S.; Lončarić M.; Zorc H.; Wittine K.; Andjelković U.; Josic D. (2016.): Synthesis, characterisation and in vitro investigation of photodynamic activity of 5-(4-octadecanamidophenyl)-10,15,20-tris(Nmethylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride on HeLa cells using low light fluence rate. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 15, 1-12.
- Malatesti N.; Munitić I.; Jurak I. (2017.): Porphyrin based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophysical reviews*, 9(2), 149-168.
- Nyman E. S.; Hynninen P. H. (2004.): Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73(1-2), 1-28.
- Orlandi V. T.; Caruso E.; Tettamanti G.; Banfi S.; Barbieri P. (2013.): Photoinduced antibacterial activity of two dicationic 5,15-diarylporphyrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 127, 123-132.
- Pereira M. A.; Faustino M. A. F.; Tomé J. P. C.; Neves M. G. P. M. S.; Tomé A. C.; Cavaleiro J. A. S.; Cunha A.; Almeida A. (2014.): Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(4), 680-690.
- Pisarek S.; Maximova K.; Gryko D. (2014.): Strategies toward the synthesis of amphiphilic porphyrins, *Tetrahedron*. 70(38), 6685-6715.
- Rakić A.; Perić J.; Štambuk-Giljanović N. (2013.): Prisutnost bakterija Legionella pneumophila u toploj vodovodnoj vodi u ovisnosti o ekološkim čimbenicima. *Hrvatske vode*, 83, 1-6.
- Rathore, M. H (2018.): Legionella Infection, dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/965492-overview#a4>, pristupljeno: 15.6.2018.
- Rosa, L.P.; da Silva, F.C. (2014): Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. *Medical Microbiology & Diagnosis*, 3(4), 1-7.
- Rossi G.; Goi D.; Comuzzi C (2012.): The photodynamic inactivation of Staphylococcus aureus in water using visible light with a new expanded porphyrin. *Journal of Water and Health*, 10(3), 390-399.
- Stallivieri A.; Le Guern F.; Vanderesse R.; Meledje E.; Jori G.; Frochot C.; Acherar S. (2015.): Synthesis and photophysical properties of the photoactivatable cationic porphyrin 5-(4-N-dodecylpyridyl)-10,15,20-tri(4-N-methylpyridyl)-21H,23H-porphyrin tetraiodide for anti-malaria PDT. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(7), 1290-1295.
- Wilson B.C.; Patterson M.S. (2008.): The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, 53(9), 61-109.
- World Health Organization (2007.): Legionella and the prevention of legionellosis, dostupno na: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf, pristupljeno: 15.6.2018.

The photodynamic effect of porphyrin on Legionella

Abstract. *Legionella pneumophila* is a gram-negative bacterium whose natural habitat is water, including rivers, lakes and streams. *L. pneumophila* is the cause of Pontiac fever and Legionnaires' disease. Contaminated water distribution systems and air humidifiers are just some of the infection sources. Despite the implementation of anti-epidemic measures, the occurrence of Legionnaires' disease is increasingly frequent, thus requiring a development of new methods for removing legionella from water. One of the approaches is antimicrobial photodynamic therapy, which involves the joint action of photosensitizer, molecular oxygen and visible light of a certain wavelength to produce singlet oxygen and reactive oxygen species that kill the microbial cell. In this paper, minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of different porphyrins on *L. pneumophila* were determined with broth dilution method. We used red light in the total dose of 24 J cm^{-2} , while the illumination lasted 10 minutes. The strongest antibacterial effect was established for amphipathic porphyrin. Further studies on the efficiency of these compounds and the use of photodynamic therapy in the inactivation of Legionella in water are required.

Key words: amphipathic porphyrin, antimicrobial photodynamic therapy, *Legionella pneumophila*

Photodynamische Wirkung von Porphyrinen auf Legionellen

Zusammenfassung. *Legionella pneumophila* ist ein gramnegatives Bakterium, dessen natürliches Habitat Wasser einschließlich des Wassers von Flüssen, Seen und Bächen ist. Es ist Auslöser des Pontiac-Fiebers und der Legionärskrankheit, und die Infektionsquellen sind unter anderem kontaminierte Wasserleitungen und lufttechnische Anlagen zur Regulierung der Luftfeuchtigkeit. Obwohl vorbeugende Maßnahmen gegen Epidemien durchgeführt werden, treten Legionellose immer häufiger auf, so ist es notwendig, neue Methoden zur Beseitigung von Legionellen aus Wasserleitungen zu entwickeln. Ein möglicher Ansatz ist die antibakterielle photodynamische Therapie, bei der drei Komponenten, Photosensibilisator, molekularer Sauerstoff und Licht einer bestimmten Längenwelle zusammenwirken, damit der Singulett-Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die für die bakterizide Wirkung verantwortlich sind. In diesem Beitrag wurden minimale Hemmkonzentrationen und minimale bakterizide Konzentrationen verschiedener Porphyrinen unter Anwendung des Bouillonverdünnungsverfahrens bestimmt. Rotes Licht wurde in Gesamtdosis von 24 J cm^{-2} für eine Dauer von 10 Minuten angewendet. Die stärkste antibakterielle Wirkung wurde beim amphipathischen Porphyrin festgestellt. Weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit dieser Verbindungen und Anwendung der photodynamischen Therapie in der Inaktivierung von Legionellen in Wasserleitungen sind notwendig.

Schlüsselwörter: amphipathisches Porphyrin, antibakterielle photodynamische Therapie, *Legionella pneumophila*