

FOTOTOXICKÝ VLIV PORFYRINOVÝCH SENSITIZERŮ A VIDITELNÉHO ZÁŘENÍ NA GRAM-POZITIVNÍ METHICILIN-REZISTENTNÍ KMEN *S. AUREUS*

Adela Hanakova¹, Katerina Bogdanova², Katerina Tomankova¹, Klara Pizova¹,
Jakub Malohlava¹, Svatopluk Binder¹, Robert Bajgar¹, Katerina Langova¹, Milan
Kolar², Jiri Mosinger³, Hana Kolarova¹

¹Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Institut molekulární a translační medicíny, Olomouc, Česká republika

²Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

³Ústav anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika

Souhrn

Použití antimikrobiální fotodynamické terapie (aPDT) jako terapeutické možnosti pro léčbu lokálních mikrobiálních infekcí představuje nově se vyvíjející oblast. Výskyt kmenů rezistentních k antibiotikům poskytuje impuls pro vývoj nových látek nebo technologických objevů k boji proti těmto rezistentním sloučeninám. Jako u PDT jsou hlavními komponentami antimikrobiální fotodynamické terapie světlo vhodné vlnové délky fotosensitivní látka (sensitizer) a vzniklé kyslíkové reaktivní částice. V této práci jsou pro antimikrobiální fotodynamickou terapii zkoumány fotosensitizery TMPyP a ZnTPPS₄. Uvedené porfyriny jsme testovali na bakteriálním methicilin – rezistentním kmenu MRSA samotné i ve vazbě s hp-β-cyklodextrinem. LEDs (414 nm) byly použity intenzity záření 0 a 150 J/cm². Testované koncentrace byly od 0,78 do 100 μM. Touto experimentální prací se dokázalo, že TMPyP je velmi úspěšnou komponentou v aPDT. Naopak ZnTPPS₄ byl účinný pro vyhubení gram-pozitivních bakterií pouze ve vyšších koncentracích.

Klíčová slova

antimikrobiální fotodynamická terapie, porfyriny, modré světlo, dioda emitující světlo

Abstract

The use of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) as a therapeutic modality for the treatment of localized microbial infections represents an developing new field. The emergence of strains resistant to antibiotics has provided the necessary impulse for new drug or technology discoveries to combat these resistant compounds. Although the aPDT is still in infancy, its need is still growing. Like PDT, main components of antimicrobial photodynamic therapy are appropriate light, dye called photosensitizer and created reactive oxygen species. In this article photosensitizers TMPyP and ZnTPPS₄ are investigated for antimicrobial photodynamic therapy. We tested these porphyrins on bacterial methicilin – resistant strain MRSA alone and bound in complex created with hp-β-cyclodextrin. The light emitting diodes (414 nm) were used at the doses 0 and 150 J/cm². Tested concentrations were from 0.78 to 100 μM. This experimental work predicated that TMPyP is very successful compound in aPDT. In contrary to ZnTPPS₄ which was efficient for eradication of tested gram-positive bacteria only in higher concentrations.

Keywords

Antimicrobial photodynamic therapy, porphyrins, blue light, light emitting diod

Úvod

PDT i aPDT využívá schopnosti látky (fotosensitizeru) absorbovat viditelné záření o vhodné vlnové délce, což vede k vytvoření excitovaného tripletního stavu molekuly fotosensitizeru. Následuje přenos energie na molekulu kyslíku a tvorba reaktivního singletního kyslíku, který způsobí buněčnou smrt [1].

Hlavní faktory k úspěšné aPDT zahrnují optimalizaci typu a koncentrace fotosensitizeru a intenzitu záření [2]. Do budoucna můžeme počítat s léčbou rezistentních bakteriálních onemocnění, především lokálních infekcí, jejichž počet neustále roste, a dosavadní léčba není příliš úspěšná. Důvodem nepříliš kladných výsledků bývají infikované, špatně prokrvené tkáně nebo přítomnost bakteriálního biofilmu [3].

V současnosti vede časté užívání antibiotik k urgentní potřebě nových, vyhovujících, nenákladných a rezistenci nezpůsobujících léčebných metod v boji s rezistentními bakteriemi, především s methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* [4]. Tento patogen způsobuje hlavně u hospitalizovaných pacientů s popáleninami kůže 75 % infekcí, vedoucích často až ke smrti pacientů [5].

Obecně lze říct, že gram-pozitivní bakterie jsou vůči aPDT více citlivé. Důvodem je stavba buněčné stěny, na kterou se fotosensitizer váže snáze a rychleji, než je tomu u gram-negativních bakterií [6]. V této práci se tedy snažíme popsat úspěšné výsledky, kterých bylo dosaženo ozářením pomocí systému LED diod o vlnové délce 414 nm s použitím dvou porfyrinových fotosensitizerů. Antimikrobiální fotodynamická terapie se aplikovala s cílem vyhubit kolonie *MRSA* a minimalizovat tak následnou viabilitu kmene.

Materiál a metody

Fotosensitizer, cykloextrin, zdroj a intenzita záření

Použili jsme pro aPDT dva fotosensitizer (PS) - ZnTPPS₄ (připravený J. Mosingerem) a TMPyP (komerčně zakoupený v Sigma Aldrich). Před použitím se rozpustily v PBS a uchovaly se v -20 °C ve tmě. Byly použity koncentrace: 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25, 50 a 100 μmol/l. Abychom dosáhli vyšší účinnosti při *in vitro* terapii, připravili jsme kromě roztoků pouze s porfyriny i vzorky obsahující komplex s hp-β-cykloextrinem (Sigma-Aldrich). Poměry komplexu PS:CD byly také připraveny v PBS v poměrech 1:4, 1:1 a 2:1.

Jako zdroj záření byla použita soustava LED diod o vlnové délce odpovídající maximu použitých fotosensitizerů 414 nm. Testované vzorky bakterií

s fotosensitizerem nebo komplexem PS:CD byly za aerobních podmínek vystaveny intenzitě záření 150 J/cm² (□ 56 minut) při teplotě 37 °C.

Bakteriální kmen a podmínky kultivace

Byly odebrány 1–2 kolonie gram-pozitivního bakteriálního kmene *S. aureus MRSA* (methicilin-rezistentní) 4591, které se nechaly narůst v aerobních podmínkách ve 2 ml bujónu (Himedia) při 37 °C, 5% CO₂ po dobu 45 minut ve tmě. Následně se odebralo do každé jamky 96-jamkové destičky 50 μl suspenze, odpovídající 1 x 10⁶ CFU/ml.

aPDT

Antimikrobiální fotodynamická terapie se prováděla po jednotlivých krocích, jako jsou příprava a kultivace bakterií, příprava potřebných koncentrací fotosensitizerů a komplexů s cykloextriny. Byly použity porfyriny TMPyP a ZnTPPS₄ k otestování a stanovení viability kmene *MRSA* a poklesu růstu bakteriálních kolonií. Vzorky na deskách byly rozděleny do několika skupin (Tab. 1). Toto členění sloužilo pro získání výsledků na porovnání samotné antimikrobiální PDT, dále pro ověření pozitivní a negativní kontroly a pro stanovení cytotoxicity na bakteriálním kmeni *MRSA*. Ve všech případech se pokaždé použilo 50 μl bakteriální suspenze (10⁶ cells/mL) inkubované za uvedených podmínek s fotosensitizerem o koncentracích v rozmezí 0,78 μmol/l do 100 μmol/l. Po inkubaci a samotném ozáření byly měřeny absorbance pomocí spektrofotometru (BioTek, Winooski, Vermont, USA) v programu Gen5 každou hodinu po dobu 24 hodin.

Z hodnot byly sestrojeny růstové křivky a bylo vypočteno % zastoupení živých bakterií. Růstové křivky vyjadřují nárůst absorbance odpovídající množství bakterií v závislosti na čase.

Stanovení viability bakteriálního kmene

Procentuální vyjádření počtu bakterií, které nejsou citlivé na aPDT, se stanovuje z hodnot naměřených absorbancí při vlnové délce 630 nm ve vybraných časových úsecích (1).

Procentuální inhibice růstu se u všech skupin testovaných bakterií kmene *MRSA* byla stanovena pomocí rovnice

$$(A_X - A_0)/(A_C - A_0) \times 100. \quad (1)$$

A_X (absorbance při dané koncentraci) a A_C (absorbance kontrolního vzorku v PBS) jsou absorbance měřené po 45 minutách inkubace ve tmě v intervalech 0, 6, 12, 18

a 24 hodin, A_0 představuje pro léčené a kontrolní suspenze počáteční hodnoty absorbance.

Tab. 1: Tabulka znázorňuje rozdělení vzorků pro aplikaci aPDT. Skupina č. 1 zastupuje pozitivní kontrolu, skupina č. 2 slouží pro vyloučení cytotoxicity, skupina č. 3 je popsána pro standardně provedenou aPDT a skupina č. 4 zastupuje negativní kontrolu.

	Dávka záření	PS	Poměr PS:CD	PBS
Skupina č. 1	150 J/cm ²	-	-	Ano
Skupina č. 2	0 J/cm ²	TMPyP ZnTPPS ₄	1:4 1:1 2:1	Ne
Skupina č. 3	150 J/cm ²	TMPyP ZnTPPS ₄	1:4 1:1 2:1	Ne
Skupina č. 4	0 J/cm ²	-	-	Ano

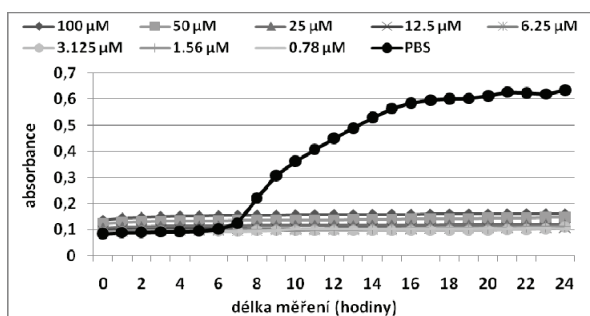
Statistika

K popisu růstu bakterií se použily regresní koeficient a intervaly spolehlivosti (95% CIs). Analýzy se prováděly s SPSS software vision 15 (SPSS, Ing. Chicago, USA) a statistická signifikance byla určena pro $p < 0.05$.

Výsledky a diskuze

aPDT

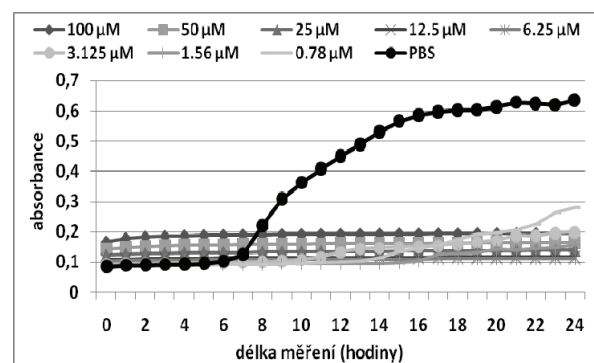
Pro testovaný kmen *MRSA* se při aplikaci aPDT prokázaly účinné všechny ověřované koncentrace fotosensitizeru TMPyP v poměru 1:1 s CD (Graf 1). Došlo tu k výraznému poklesu růstu bakterií.



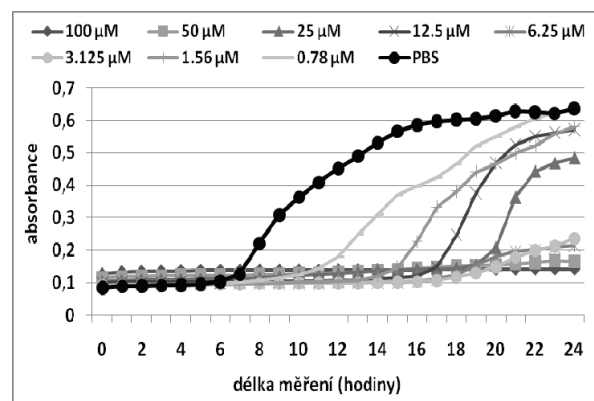
Graf 1: Růstové křivky pro *MRSA* kmen při aplikaci fotosensitizeru TMPyP s CD v poměru 1:1.

V grafu 2 můžeme vidět eliminovaný růst *MRSA*, běžný růst kontrolní křivky *MRSA* v PBS a nepatrný nárůst křivky v koncentraci 0,78 µM bez aplikace CD. Ostatní koncentrace TMPyP v kombinaci se zářením o vlnové délce 414 nm snížily růst bakterií na minimum.

Prezentovaná data v grafu 3 ukazují nižší účinnost fotosensitizeru ZnTPPS₄ s CD v poměru 1:1. Růstové křivky *MRSA* pro ZnTPPS₄:CD v poměru 1:1 rostly v nejnižších koncentracích téměř shodně jako kontrolní růstové křivky bakterií, pouze s časovou prodlevou od 12. do 18. hodiny měření. Pokles růstu bakterií je zřejmý pouze v nejvyšších koncentracích 100 až 12,5 µM.

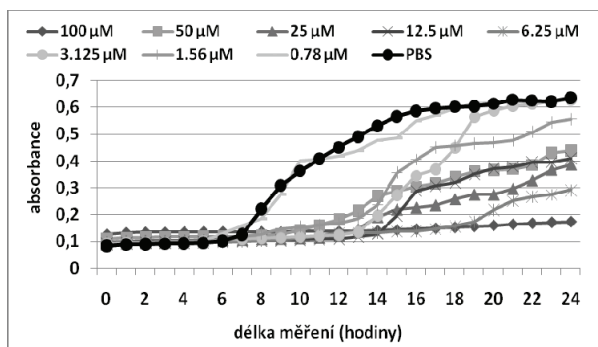


Graf 2: Růstové křivky pro *MRSA* kmen při aplikaci fotosensitizeru TMPyP bez CD.



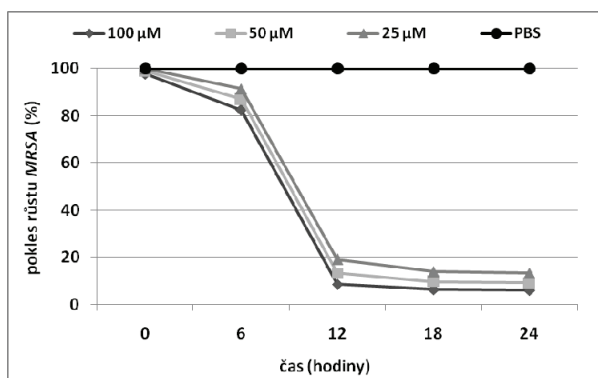
Graf 3: Růstové křivky pro *MRSA* kmen při aplikaci fotosensitizeru ZnTPPS₄:CD 1:1.

V případě použití ZnTPPS₄ bez CD nedochází k poklesu růstu kmene *MRSA*, pouze pro 100 µM koncentraci je růst zredukován na 17 %. Konkrétní růstové křivky po aPDT jsou zobrazeny v grafu 4.

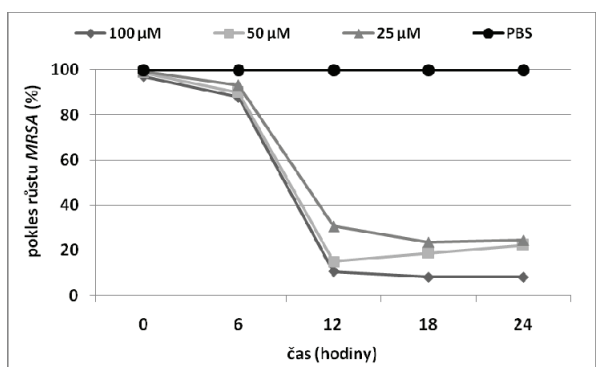


Graf 4: Růstové křivky pro MRSA kmen při aplikaci fotosensitizeru ZnTPPS₄ bez CD.

Na následujících dvou grafech 5 a 6 je vyneseno pokles růstu v procentech pro kmen MRSA během 0, 6, 12, 18 a 24 hodin. Je vidět, jak se snižuje nárůst MRSA po aPDT při aplikaci TMPyP s CD v poměru 2:1 a ZnTPPS₄ s CD v poměru 1:4. V případě TMPyP klesla životnost ve všech zobrazených koncentracích výrazně pod 20 %, u ZnTPPS₄ tomu tak je v případě 100 μM koncentrace.



Graf 5: Závislost poklesu růstu MRSA na čase pro TMPyP s CD v poměru 2:1.



Graf 6: Závislost poklesu růstu MRSA na čase pro ZnTPPS₄ s CD v poměru 1:4.

Tab. 2: Hodnoty životností po aPDT pro MRSA kmen a fotosensitizer ZnTPPS₄ s CD v poměru 2:1. Kontrolní křivka běžného růstu bakterií v PBS byla označena jako kontrola a ostatní výpočty se k ní vztahovaly jako ke 100%.

Koncentrace [μM]	Životnost MRSA [%]	Koncentrace [μM]	Životnost MRSA [%]
100	4	6,25	93
50	4	3,125	93
25	14	1,56	93
12,5	57	0,78	93

Staphylococcus aureus i další bakteriální druhy je možno vystavením modrému světlu v oblasti 400–420 nm fotodynamicky inaktivovat [7].

Aplikace aPDT s sebou stále nese některé otázky, na které je třeba odpovědět:

- Které bakterie jsou citlivé na ozáření?
- Jaký je přímý účinek na mikrobiální populaci?
- Jaký typ fotosensitizeru se selektivně váže na různé druhy bakterií?
- Jaká je vhodná terapeutická koncentrace PS?
- Jaké jsou přijatelné parametry záření (vlnová délka, délka expozice ...)? [8].

Nicméně lze zdůraznit, že ačkoli je zatím tato oblast na počátku vývoje, posunuje se stále kupředu a objevuje se na toto téma pořád více publikací orientovaných směrem k antimikrobiální fotodynamické terapii, které potvrzují možnou inaktivaci gram-pozitivních, ale i gram-negativních bakteriálních kmenů [9, 10]. Jako alternativa se aPDT může užívat v léčbě lokálních infekcí (v ústech nebo na pokožce) a zamezit tak rozvoji rezistence na systémová léčiva [11].

Jelikož aktuální využití aPDT v klinické praxi závisí na baktericidní aktivitě a zároveň na cytotoxicitě vůči okolní hostující tkáni [12], naše předchozí publikace byla zaměřena i na PDT nenádorové buněčné linie NIH3T3 (myší fibroblasty). Pro porovnání a z důvodu aplikace PDT také v oblasti tumorů [13], jsme testovali fotosensitizery i na nádorovou buněčnou linii HeLa.

Tato publikace demonstruje současnou práci, která byla úspěšná především z hlediska dosažení kladných výsledků inaktivace růstu bakterií pro kationtový fotosensitizer TMPyP, a to i ve velmi nízkých koncentracích.

Statistika

Statisticky významné regresní koeficienty a 95% CI (levá a pravá mez) se stanovily u MRSA kmene pro fotosensitizer ZnTPPS₄ ve všech koncentracích 100 až 25 μM, v případě s CD v poměru 1:4 - 12,5 až 1,56

μM , v poměru 1:1 - 6,25 a 3,125 μM , v poměru 2:1 a bez CD - 12,5 a 6,25 μM . Pro fotosensitizer TMPyP byly regresní koeficienty významné ve všech koncentracích a poměrech s CD i bez CD.

Závěr

Světlo o vlnové délce 414 nm v oblasti elektromagnetického spektra odpovídá absorpčnímu maximu porfyrinů ZnTPPS_4 a TMPyP, které byly použity pro navození fotodynamického jevu, a tedy k *in vitro* antimikrobiální, nádorové i nenádorové terapii.

V budoucnu se naše práce bude ubírat směrem kombinace aPDT s antibiotiky. Perspektivou bude možné zesílení efektu s použitím antibiotik, se kterými momentálně vykazují gram-pozitivní i gram-negativní kmeny rezistenci.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantovými projekty 303/09/H048, CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a LF_2012_019.

Literatura

- [1] O'Riordan, K., Akilov, O. E., Hasan, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, 2: 247–262.
- [2] Chan Y., Lai CH. H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, 2003, 18: 51–55.
Strnadova, A., Roubik, K. Document for the paper for YBERC 2010. *Lékař a Technika*, 2010, vol. 15, no. 1, p. 1–2.
- [3] Hamblin M. R., Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, 2004, 3:436–450.
- [4] Tavares A., Carvalho C. M. B., Faustino M. A., Neves M. G. P. M. S., Tomé J. P. C., Tomé A. C., Cavaleiro J. A. S., Cunha A., Gomes N. C. M., Alves E., Almeida A. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar. Drugs*, 2010, 8: 91–105.

- [5] Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, 85: 28–38.
- [6] Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *Journal of environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 2006, 25(1-2): 505–519.
- [7] Maclean M., MacGregor S. J., Anderson J. G., Woolsey G. A. The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2008, 92: 180–184.
- [8] Calin M. A., Parasca S. V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers Med Sci*, 2009, 24:453–460.
- [9] Ganz R. A., Viveiros J., B. Ahmad A., Ahmadi A., Khalil A., Tolkoff M. J., Nishioka N. S., Hamblin M. R. *Helicobacter pylori* in Patients Can Be Killed by Visible Light. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005, 36:260–265.
- [10] Hamblin M. R., Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*, 2004, 3:436–450.
- [11] Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, 85: 28–38.
- [12] Lambrechts S. A. G., Demidova T. N., Aalders M. C. G., Hasan T., Hamblin M. R. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci.*, 2005, 4(7): 503–509.
- [13] Kudina N. V., Berezov T. T. Photodynamic Therapy of Cancer: Search For Ideal Photosensitizer, *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2010, 4(1): 95–103.

Mgr. Adéla Hanáková
Katedra lékařské biofyziky
Lékařská fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci
Hněvotínská 3, CZ-775 15 Olomouc

E-mail: a.hanakova@upol.cz
tel.: +420 585 632 110