

# Tripiridilporfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela

---

**Peradinović, Josip**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:428714>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Preddiplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Josip Peradinović

Tripiridilporfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Preddiplomski sveučilišni studij  
Biotehnologija i istraživanje lijekova

Josip Peradinović

Tripiridilporfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela

Završni rad

Rijeka, 2018. godina

Mentor rada: Doc. dr. sc. Nela Malatesti

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Undergraduate programme  
Biotechnology and drug research

Josip Peradinović

Tripyridylporphyrins in photodynamic inactivation of legionellae

Bachelor's thesis

Rijeka, 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Nela Malatesti

Ko-mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Završni rad je obranjen dana 19.09.2018.

Pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Željka Maglica - predsjednica povjerenstva
2. Doc. dr. sc. Rozi Andretić Waldowski
3. Doc. dr. sc. Nela Malatesti
4. Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Rad ima 37 stranica, 13 slika, 4 tablice i 30 literaturnih navoda.

## Sažetak

Gram-negativna bakterija *Legionella pneumophila* je sveprisutna u vodenim i vlažnim područjima. Zbog njene rezistentnosti na određene skupine protumikrobnih lijekova, nužni su novi pristupi u eradikiranju ove bakterije. U ovom radu istražila se mogućnost primjene fotodinamičke inaktivacije u dezinfekciji vode koja bi mogla imati primjenu u budućnosti kako bi se onemogućilo širenje zaraze uzrokovane navedenom bakterijom. Fotodinamička inaktivacija je novi pristup u eradikaciji bakterija te zahtijeva prisustvo fotosenzibilizatora, molekularnog kisika te svjetlosti. Izlaganje molekule fotosenzibilizatora svjetlosti uzrokuje nastanak reaktivnih kisikovih vrsta ili singletnog kisika koji uzrokuje smrt bakterijske stanice. Kao fotosenzibilizator u ovom radu se koristio amfifilni porfirin, 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin. Određena je minimalna efektivna koncentracija dilucijskom metodom koja se koristila u testu fotoinaktivacije. Svi eksperimenti provedeni su u sterilnoj vodi iz slavine te se koristila ljubičasta svjetlost intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>. U istraživanju se pokazalo kako je ispitivani spoj djelotvorniji nakon svjetlosne aktivacije te da ima učinak protiv stvaranja biofilma. Također se provelo ispitivanje djelovanja otopine spoja 2,5 mjeseca nakon pripreme.

U istraživanju su određene vrijednosti koncentracija  $MEK_s = 0,391 \mu\text{M}$ ,  $MEK_{2,5} = 0,195 \mu\text{M}$ . Nakon izvođenja testa toksičnosti u mraku određene su vrijednosti  $MEK_s = 6,25 \mu\text{M}$  te  $MEK_{2,5} = 25 \mu\text{M}$ . Koncentracije koje inhibiraju adheziju iznosile su  $MEK = 0,391 \mu\text{M}$  nakon izlaganja svjetlosti te  $MEK = 0,781 \mu\text{M}$  bez izlaganja svjetlosti.

Ključne riječi: *Legionella pneumophila*, rezistencija na protumikrobne lijekove, fotodinamička inaktivacija, amfifilni porfirin, dezinfekcija vode

## Summary

Gram-negative bacterium *Legionella pneumophila* is ubiquitous in water and moist areas. Because of its resistance to certain types of antimicrobial drugs, the new ways of eradication are needed. The possibility of application of photodynamic inactivation in water disinfection, which may have a potential application to arrest the spreading of infection caused by aforementioned bacterium, will be presented in this work. Photodynamic inactivation is a new approach in eradication of bacteria and requires the presence of photosensitizer, molecular oxygen and light. Exposure of photosensitizer to light results in generation of reactive oxygen species or singlet oxygen which cause the death of bacterial cell. Amphiphilic porphyrin, 5-(4-octadec-9-enamidophenyl)-10,15,20-tris(3-pyridyl)porphyrin, was used as a photosensitizer in this work. Minimal effective concentration has been determined by microdilution method and it was used in the photoinactivation test. All experiments were conducted in tap water and violet light with 40 mW/cm<sup>2</sup> fluence was used. The tested compound was shown to be more effective after the light activation and also has an effect against the production of biofilms. An examination of the effect of the solution 2,5 months after the preparation was also conducted.

Concentrations which are determined in this research include  $MEC_s = 0,391 \mu\text{M}$ ,  $MEC_{2,5} = 0,195 \mu\text{M}$ . After the dark toxicity test concentrations valued  $MEC_s = 6,25 \mu\text{M}$  and  $MEC_{2,5} = 25 \mu\text{M}$ . Concentrations which inhibits adhesion valued  $MEC = 0,391 \mu\text{M}$  after exposure to light and  $MEC = 0,781 \mu\text{M}$  after dark toxicity test.

**Key words:** *Legionella pneumophila*, antimicrobial drug resistance, photodynamic inactivation, amphiphilic porphyrin, water disinfection

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Mehanizam fotodinamičke inaktivacije .....	2
1.1.1. Fotofizikalni procesi .....	2
1.1.2. Fotokemijski procesi .....	3
1.2. Fotosenzibilizatori u fotodinamičkoj inaktivaciji .....	3
1.3. Porfirini .....	4
1.4. Izvori svjetlosti u fotodinamičkoj inaktivaciji .....	6
1.5. Djelovanje fotosenzibilizatora na bakterije .....	6
1.6. <i>Legionella pneumophila</i> .....	8
1.6.1. Epidemiologija i patogeneza .....	8
1.6.2. Legioneloze .....	9
1.7. Primjene fotodinamičke inaktivacije .....	10
2. Cilj rada .....	11
3. Materijali i metode .....	12
3.1. Korišteni materijali .....	12
3.2. 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin .....	13
3.3. Bakterijski soj .....	14
3.4. Hranjiva podloga i medij .....	15
3.4.1. Voda iz slavine .....	15
3.4.2. BCYE agar .....	15
3.5. Bakterijski inokulum .....	15
3.6. Određivanje minimalne efektivne koncentracije dilucijskom metodom .....	16
3.7. Anti-adhezija na polistiren .....	17



3.8. Test fotoinaktivacije .....	18
4. Rezultati .....	19
4.1. Minimalna efektivna koncentracija ispitana dilucijskom metodom	19
4.1.2. MEK vrijednost otopine spoja pripremljene prije 2,5 mjeseca	20
4.2. Određivanje minimalne efektivne koncentracije (toksičnost u mraku)	21
4.3. Određivanje koncentracije koja inhibira adheziju .....	21
4.4. Test fotoinaktivacije .....	23
5. Rasprava .....	25
6. Zaključci .....	28
7. Literatura .....	29
8. Životopis .....	34

## Popis kratica

$^1\text{O}_2$	singletni kisik
$^3\text{O}_2$	triplet stanje kisika
IC	unutarnja pretvorba (prema eng. <i>internal conversion</i> )
ISC	međusustavno križanje (prema eng. <i>intersystem crossing</i> )
ROS	reaktivne kisikove vrste (prema eng. <i>reactive oxygen species</i> )
aPDT	protumikrobna fotodinamička terapija (prema eng. <i>antimicrobial photodynamic therapy</i> )
PDI	fotodinamička inaktivacija (prema eng. <i>photodynamic inactivation</i> )
PACT	fotodinamička protumikrobna kemoterapija (prema eng. <i>photodynamic antimicrobial chemotherapy</i> )
PS	fotosenzibilizator (prema eng. <i>photosensitizer</i> )
MEK	minimalna efektivna koncentracija
MEK <sub>s</sub>	minimalna efektivna koncentracija svježe otopine spoja
MEK <sub>2,5</sub>	minimalna efektivna koncentracija otopine spoja pripremljene prije dva i pol (2,5) mjeseca

## 1. Uvod

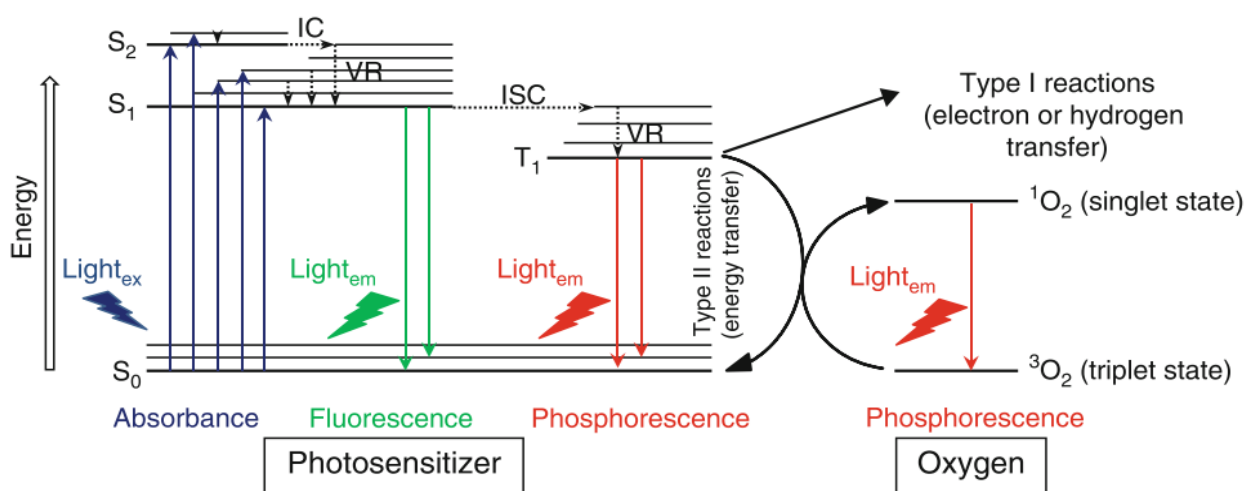
Zbog porasta broja rezistentnih sojeva na protumikrobne lijekove, potrebni su novi pristupi u eradikaciji istih. U te se mikrobe ubraja i *Legionella pneumophila* koja pripada razredu *Gammaproteobacteria* i porodici *Legionellaceae* [1]. Uzrokuje legionarsku bolest i pontijačku groznicu, a rezistentna je na  $\beta$ -laktamske protumikrobne lijekove (penicilini, cefalosporini) jer posjeduje enzim  $\beta$ -laktamazu. Također je rezistentna na djelovanje vankomicina i aminoglikozida [2]. *L. pneumophila* nastanjuje vodu gdje nerijetko stvara biofilme i time postaje otporna na djelovanje klora, a prenosi se udisanjem aerosola. Kako bi se spriječili novi slučajevi oboljenja, nužni su novi pristupi u dezinfekciji vode kao što je, primjerice, fotodinamička inaktivacija.

Govoreći o fotodinamičkoj inaktivaciji, potrebno je napomenuti kako se koriste tri pojma istoga značenja: protumikrobna fotodinamička terapija (APDT, prema eng. *antimicrobial photodynamic therapy*), fotodinamička protumikrobna kemoterapija (PACT, prema eng. *photodynamic antimicrobial chemotherapy*) te fotodinamička inaktivacija (PI ili PDI, prema eng. *photodynamic inactivation*). U ovom radu koristit će se kratica PDI. PDI predstavlja novi pristup u eradikaciji mikroba rezistentnih na postojeće protumikrobne lijekove [3, 4]. Za provedbu postupka nužni su: izvor (vidljive) svjetlosti, fotosenzibilizator i molekularni kisik, što bi značilo da se postupak provodi u aerobnim uvjetima [3, 5]. PDI se kao pristup može primijeniti u različitim kliničkim i ne-kliničkim slučajevima [6].

## 1.1. Mehanizam fotodinamičke inaktivacije

### 1.1.1. Fotofizikalni procesi

Fotofizikalni procesi koji se odvijaju tijekom fotodinamičke inaktivacije mogu se prikazati dijagramom Jablonskog (Slika 1.).



Slika 1. Proces fotosenzibilizacije prikazan dijagramom Jablonskog. IC (prema eng. internal conversion), VR (prema eng. vibrational relaxation), ISC (prema eng. intersystem crossing) [5].

Fotosenzibilizacija je proces kojim nastaje singletni oblik kisika ( $^1O_2$ ) zbog prijenosa energije s PS-a (fotosenzibilizator) na triplet oblik kisika ( $^3O_2$ ) u aerobnim uvjetima. Nakon što fotosenzibilizator apsorbira svjetlost određene valne duljine u obliku fotona, prelazi iz osnovnog stanja ( $S_0$ ) u pobuđeno stanje ( $S_n$ ) prilikom čega se mogu odviti dva slučaja. U prvom slučaju može doći do vraćanja u osnovno stanje prilikom čega se emitira fluorescencija ili do oslobađanja topline prilikom unutarnje pretvorbe (IC) [7]. U drugom, željenom slučaju dolazi do međusustavnog križanja (ISC) te dolazi do prijelaza između izoenergijskih stanja, tj. prijelaza iz singlet u triplet stanje iste energije [8]. Zatim može doći do povratka u osnovno stanje emitiranjem fosforescencije, prijenosa elektrona (reakcije tipa 1) ili

do prijenosa energije na molekulu kisika u triplet stanju (reakcije tipa 2) (Slika 1.) [6, 9].

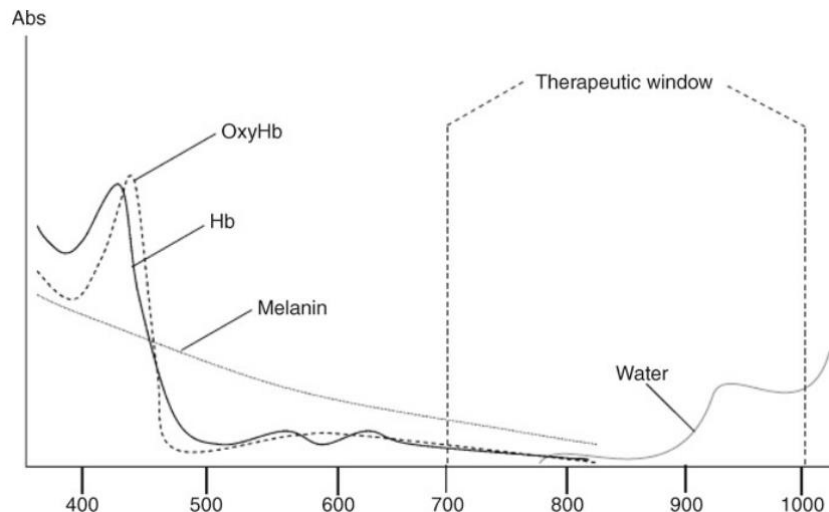
### 1.1.2. Fotokemijski procesi

Fotokemijski procesi dijele se u dvije skupine, reakcije tipa 1 i reakcije tipa 2 [10]. U reakcijama tipa 1 dolazi do prijenosa elektrona s PS-a u pobuđenom triplet stanju na molekulu kisika pri čemu nastaje superoksidni anion ( $O_2^{\cdot -}$ ) koji će uzrokovati nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS prema eng. *reactive oxygen species*) kao što su hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) te vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) [9].

U reakcijama tipa 2 dolazi do prijenosa energije s PS-a u pobuđenom triplet stanju na molekularni kisik koji se prirodno nalazi u triplet stanju, a kao posljedica nastaje singletni kisik,  $^1O_2$ . Reakcije tipa 1 i 2 mogu se odvijati paralelno, no udio tipova reakcije ovisi o korištenom PS-u te koncentraciji kisika [7].

## 1.2. Fotosenzibilizatori u fotodinamičkoj inaktivaciji

Fotosenzibilizator je molekula koja će biti pobuđena pomoću izvora svjetlosti koji emitira zračenje određene valne duljine te će u pobuđenom stanju izazvati željeni toksični učinak na metu bez štetnih učinaka na domaćina. U kliničkoj primjeni spominje se pojam terapijskog prozora. Terapijski prozor podrazumijeva interval valnih duljina u kojemu će biomolekule slabo ili neće apsorbirati zračenje.



Slika 2. Prikaz terapijskog prozora koji uključuje valne duljine 700 - 1000 nm [7].

U najčešće korištene fotosenzibilizatore spadaju porfirini, ftalocijanini, ksanteni, fenotiazini,  $\delta$ -aminolevulinska kiselina, hipericin, klorini, itd. [5, 6]

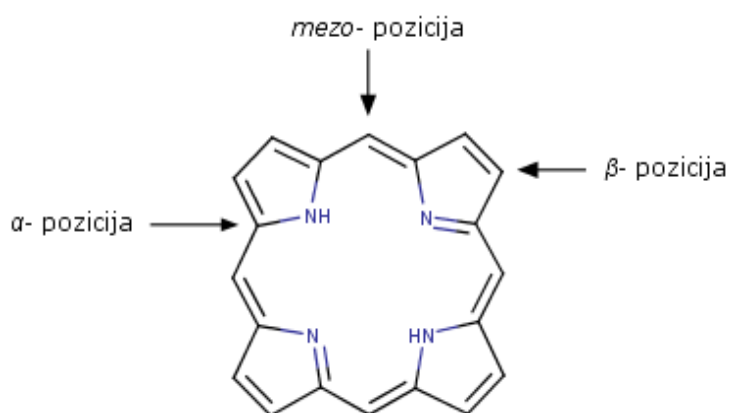
Postoje tri generacije PS-a. U prvu generaciju spadaju derivati hematoporfirina (HpD), u drugu spojevi na bazi tetrapirola (npr. porfirini, ftalocijanini), a u treću npr. PS-i konjugirani s protutijelima [7]. Također, PS-i se dijele i na hidrofilne, hidrofobne i amfifilne [11].

### 1.3. Porfirini

Riječ porfirin dolazi od grčke riječi „*porphura*” što znači ljubičast, a otopine porfirina su intenzivno obojene [12]. Nalaze se i u bitnim makromolekulama kao što su hemoglobin, mioglobin, citokromi P450, itd. te sudjeluju u bitnim biološkim procesima poput prijenosa kisika i ugljikova dioksida.

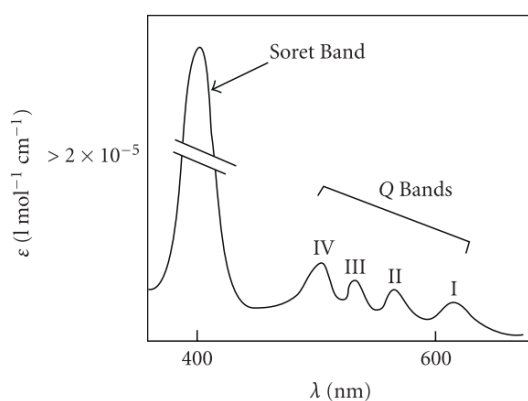
Porfin je makrociklička struktura koja se sastoji od 4 pirolna prstena međusobno povezanih metinskim mostovima te sadrži  $\alpha$ -,  $\beta$ - i mezo-pozicije. Ukoliko se na  $\beta$ - i mezo-pozicijama nalaze drugi supstituenti (da

nisu atomi vodika), onda se spoj naziva porfirin [13]. Porfin je odgovoran za apsorpciju u vidljivom i bliskom-UV spektru jer sadrži sustav konjugiranih dvostrukih veza [14].



Slika 3. Porfin s naznačenim  $\alpha$ -,  $\beta$ - i mezo- pozicijama.

Zahvaljujući konjugiranom sustavu  $\pi$ -elektrona, porfirini imaju specifični UV/Vis apsorpcijski spektar, točnije apsorbiraju u bliskom-UV i vidljivom spektru. U tom spektru vidljive su karakteristične vrpce, Soret ili B vrpca te Q vrpce. Soret vrpca prikazuje veliki elektronski prijelaz iz osnovnog u drugo pobuđeno stanje ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) i nalazi se u intervalu 380 - 400 nm, ovisno o supstituentima na  $\beta$ - i mezo- pozicijama. Q vrpce su rezultat slabog elektronskog prijelaza iz osnovnog u prvo pobuđeno stanje ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) i nalaze se u intervalu 500 - 750 nm [12, 15]. Na temelju jačina Q vrpca, porfirine možemo podijeliti na *etio*-, *rhodo*-, *okso-rhodo*- i *phylloporfirine* [15].



Slika 4. Karakterističan UV/Vis spektar porfirina sa Soret i Q vrpcoma [12].

## 1.4. Izvori svjetlosti u fotodinamičkoj inaktivaciji

Kao prvi izvor svjetlosti u fotodinamičkoj inaktivaciji koristila se obična žarulja, no pokazivala je nedostatke poput polikromatnosti, velike proizvodnje topline i nekoherencije. Izvori koji se danas koriste su svjetiljke, laseri i LED (prema eng. *light emitting diode*) [6].

Svjetiljke su u mogućnosti emitirati široki spektar i zato je nužno koristiti razne filtere. Prednosti svjetiljki su jednostavnost uporabe te prenosivost, a glavni nedostatak je ograničenost na kožu. Postoje živine, ksenonske, natrijeve, fluorescentne svjetiljke, itd. [8, 16, 17].

Laseri su izvori monokromatske svjetlosti koje karakterizira proizvodnja koherentnih elektromagnetskih polja od bliskog infracrvenog do ultraljubičastog zračenja, usmjerenost te dobra penetracija u tkiva. Laseri se s obzirom na medij dijele na lasere u čvrstom stanju, plinske lasere i lasere s bojilima [6, 16].

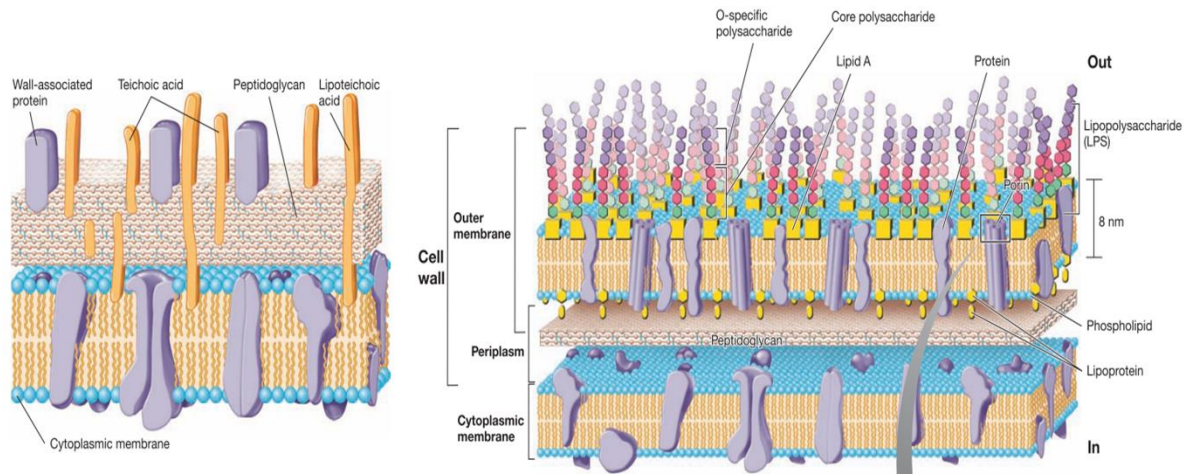
LED mogu proizvesti različite valne duljine, jeftinije su od ostalih izvora svjetlosti te kao izvor energije mogu koristiti bateriju što ih čini lako prenosivima. [6] Također postoje i OLED (organske svjetleće diode) koje emitiraju svjetlost pomoću organskih molekula [16].

## 1.5. Djelovanje fotosenzibilizatora na bakterije

Bakterije se s obzirom na bojanje po Gramu mogu podijeliti na gram-pozitivne (G+) i gram-negativne (G-). Kod G+ bakterija se na citoplazmatsku membranu nadovezuje debeli sloj peptidoglikana (može biti jedan ili više slojeva) koji je porozan. Na površini G+ bakterija nalaze se ostaci teikoične (kovalentno vezana za muraminsku kiselinu peptidoglikana) te lipoteikoične (kovalentno vezana za lipide membrane) kiseline koji se ne nalaze kod G- bakterija [1, 2, 18]. G- bakterije sadrže citoplazmatsku



membranu, periplazmatski prostor, tanji sloj peptidoglikana te vanjsku membranu. Vanjska membrana se često naziva i lipopolisaharidna (LPS) membrana koja je nosilac izrazito negativnog naboja. LPS je građen od lipida A, oligosaharidne jezgre i O-specifičnog polisaharida [1]. Opisane razlike G+ i G- bakterija vidljive su na Slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz razlike u građi G+ i G- bakterija [1].

Neka od svojstava idealnog PS-a su dobra stabilnost i topljivost, čistoća, specifičnost, niska toksičnost u mraku, niska mutagenost, apsorpcija unutar terapijskog prozora i dobra generacija  $^1O_2$  [5, 7]. Govoreći o PDI, koriste se pozitivno nabijeni (kationski), negativno nabijeni (anionski) te neutralni PS-i.

Neutralni i anionski fotosenzibilizatori pokazuju učinak na G+ bakterije, dok na G- bakterije pokazuju vrlo slabi ili nikakav učinak, osim ako na njih nisu vezani neki membrana-destabilizirajući agensi [14, 19]. U takve agense se ubrajaju polimiksin-B-nonapeptid (PMBN), poli-L-lizin (pL), polietilenimin i etilendiaminoctena kiselina (EDTA). Poznato je da EDTA i pL uzorkuju otpuštanje LPS-a u medij u kojemu se nalaze bakterije što ih čini osjetljivijima [10].

Za razliku od navedenih PS-a, kationski PS-i djeluju na G+ i G- bakterije upravo radi pozitivnog naboja koji uzrokuje elektrostatska privlačenja s

negativno nabijenom membranom [20]. Štoviše, pokazalo se da su amfifilni kationski PS-i najpogodniji jer se povećava afinitet za vezanje na bakterije i posljedično akumulacija [19].

Tijekom fotosenzibilizacije najčešće dolazi do oštećenja DNA i oštećenja citoplazmatske membrane što uzrokuje pucanje membrane ili inaktivaciju transportnih sustava i enzima [18]. Također dolazi do oksidacije nezasićenih masnih kiselina i aminokiselinskih ostataka poput triptofana, metionina, cisteina, histidina i lizina. Proteomske studije su ukazale da PDI zahvaća važne bioprocese poput biosinteze nukleotida i glikolize [13, 21].

## 1.6. *Legionella pneumophila*

*L. pneumophila* je aerobna G- bakterija koja je sveprisutna u vlažnoj zemlji, površinskim vodama i sustavima za distribuciju vode, a pojavljuje se u filamentoznom ili kokobacilarnom obliku [2, 22, 23]. Posjeduju jednu ili dvije flagele pomoću kojih se pokreću te pile. *L. pneumophila* zahtijeva posebne uvjete kultivacije, tj. prisustvo L-cisteina, željezne soli, aktivnog ugljena i kvaščeva ekstrakta. Preživljava u temperaturnom intervalu 0 - 60 °C, a razmnožavanje je optimalno na 36 - 37 °C [2].

### 1.6.1. Epidemiologija i patogeneza

*L. pneumophila* prepoznata je kao patogen nakon izbijanja slučajeva fatalnih upala pluća u Philadelphiji 1976. godine. Otporna je na grijanje i kloriranje, stoga se može pronaći u rashladnim tornjevima, bazenima, sustavima za klimatizaciju te osobito u spremnicima tople vode [1]. Štoviše, pronađena je u vodenim zalihama bolnica. *L. micdadei* je pronađena u raspršivačima koji se koriste za terapiju bolesti respiratornog sustava [24].

*L. pneumophila* napada pluća te ju makrofagi unose procesom fagocitoze. Pošto bakterija onemogućuje nastajanje fagolizosoma, fagosom postaje mjesto prijelaza iz transmisivne u replikativnu fazu. Nakon replikacije bakterija ponovno prelazi u transmisivnu fazu te dolazi do lize stanica i izlaska novih bakterija koje će drugi makrofagi fagocitirati. Poznato je i da se *L. pneumophila* može nastaniti i u praživotinjama koje tada predstavljaju prijenosnike bolesti [23].

### 1.6.2. Legioneloze

Bolesti koje uzrokuje *L. pneumophila* nazivaju se legionelozama. U legioneloze spadaju legionarska bolest i pontijačka groznica.

Legionarska bolest predstavlja atipičnu upalu pluća čiji se simptomi razvijaju 2 do 10 dana nakon ulaska bakterije u organizam. Simptomi obuhvaćaju glavobolju, visoku tjelesnu temperaturu, bolove u mišićima i prsima, kašalj, mučninu, dijareju, itd. Rizične skupine čine ljudi s oslabljenim imunološkim sustavom, ljudi stariji od 50 godina, pušači te ljudi oboljeli od teških plućnih bolesti. Bitno je što prije početi s liječenjem, a bolest se liječi konzumiranjem azitromicina, klaritromicina, eritromicina ili fluorokinolona. Moguće komplikacije su insuficijencija dišnog sustava, septički šok te akutna bubrežna insuficijencija. Bolest je fatalna u 20% slučajeva.

Pontijačka groznica je blaga bolest nalik gripi. Glavni simptomi su vrućica, glavobolja, umor, suhi kašalj, itd. Inkubacija traje 12 - 48 sati. Bolest se liječi simptomatski, najčešće uzimanjem analgetika.

## 1.7. Primjene fotodinamičke inaktivacije

U današnje vrijeme fotodinamička terapija se primjenjuje u liječenju karcinoma, makularne degeneracije, kroničnog periodontitisa, psorijaze, GVHD-a (prema eng. *graft-versus-host disease*), itd. Najviše odobrenih PS-a pripada porfirinima, ftalocijaninima i klorinima [5].

Prema istraživanjima se pokazalo kako postoji najveća mogućnost u liječenju lokaliziranih infekcija te bi se u tom slučaju PS-i primjenjivali topikalno. U različitim istraživanjima pokazane su uspješne eradikacije bakterija poput *E. coli*, *S. sanguis*, *Enterococcus spp*, *H. parainfluenzae*, *A. baumannii*, itd. Ispitivanja su se također provodila na praživotinjama (*Leishmania spp*) i drugim mikrobima uključujući gljive (*C. albicans*, *T. rubrum*) i viruse (HSV-1, HPV) [4].

Što se tiče ne-kliničkih slučajeva, smatra se da postoji moguća primjena u vode, kirurških instrumenata te krvi [6]. Međutim, jedini problem predstavlja uklanjanje PS-a iz tih medija. Govoreći o dezinfekciji vode, predložena su četiri koraka koji uključuju koagulaciju i filtraciju vode kroz pijesak, fotodinamičku dezinfekciju, uklanjanje kontaminanta i PS-a adsorpcijom na aktivni ugljen te kloriranje vode. Kao izvori svjetlosti bi se koristili umjetni izvori te Sunčeva svjetlost. Svaki korak u dezinfekciji bi sadržavao kemijske i bakteriološke indikatore. Nakon fotodinamičke dezinfekcije ovakvim postupkom u vodi nije bilo zabilježeno klostridija niti kolifaga (bakteriofagi koji napadaju *E. coli*). Prednosti ove metode su što se ne koriste štetni klorirajući agensi te se kao izvor svjetlosti koristi Sunce. Jedini nedostatak je cijena PS-a [25].

## 2. Cilj rada

Prošloga stoljeća započela je proizvodnja protumikrobnih lijekova te je u tu svrhu najviše proizvedeno penicilina i cefalosporina. Međutim, unatoč proizvodnji navedenih antibiotika, u novije vrijeme počeli su se bilježiti slučajevi umrlih od rezistentnih bakterija. U devedesetim godinama prošlog stoljeća zabilježeni su rezistentni mikrobi kao što su *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Streptococci*, *Staphylococci*, te su znanstvenici predvidjeli kako u budućnosti prijete rezistencija sljedećih bakterija, *N. meningitidis*, *K. pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Shigella*, *N. gonorrhoeae*, itd. [26].

Nažalost, danas broj sojeva rezistentnih na protumikrobne lijekove raste. Štoviše, različite vremenske neprilike koje nas zahvaćaju (tsunamiji, poplave i slično) uzrokuju nove infekcije. Ekonomska kriza je još jedan okidač. Pošto dolazi do slabijeg financiranja znanosti, dolazi i do slabijeg razvitka novih protumikrobnih lijekova koji su nam sve više potrebni [27].

Cilj ovoga istraživanja je ispitati potencijal fotodinamičke inaktivacije i djelovanje amfifilnog porfirina na *L. pneumophilu* u nekoliko testova. Odredit će se minimalna efektivna koncentracija (MEK) te će se izvesti test toksičnosti u mraku, test anti-adhezije na polistiren te test fotoinaktivacije.

Svi eksperimenti opisani u ovom radu izrađeni su na Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Gobin. Ispitivani spoj je sintetiziran na Odjelu za biotehnologiju u Rijeci u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja.

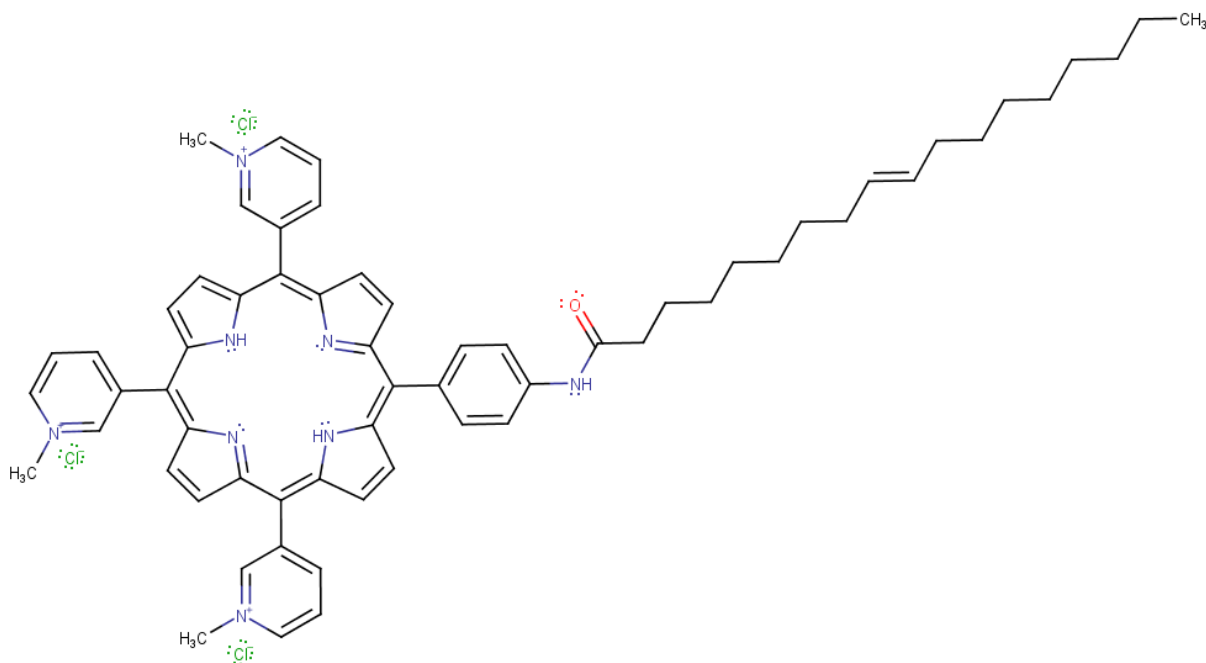
## 3. Materijali i metode

### 3.1. Korišteni materijali

- tresilica (Heidolph inkubator 1000, Njemačka)
- multikanalna pipeta 0,5 - 300  $\mu\text{L}$  (Transferpette S-8, Njemačka)
- mikropipete 2 - 20  $\mu\text{L}$ , P100 (20 - 100  $\mu\text{L}$ ), P200 (50 - 200  $\mu\text{L}$ ), 200 - 1000  $\mu\text{L}$  (Gilson, SAD)
- nastavci za mikropipete
  - Diamond Eco pack „D200“-range: 2 - 200  $\mu\text{L}$  (Gilson, SAD)
  - Diamond Eco pack „D1000“-range: 100 - 1000  $\mu\text{L}$  (Gilson, SAD)
- mikrotitarska pločica (96 well, ROLL Piove di Sacco, Italija)
- autoklavirana voda iz slavine
- BCYE (prema eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) agar
- staklene epruvete od 15 mL s čepom
- plastična ušica
- ultrazvučna kupelj (Bandelin-BactoSonic, Njemačka)
- plastične Petrijeve zdjelice
- spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- aluminijska folija (Alluminio Brian Roll, Italija)
- inkubator (Termo-medicinski aparati, Bodalec & Havoić, Dugo Selo - Zagreb, Hrvatska)
- šprice
- filteri
- LED lampa - 394 nm, 40 mW/cm<sup>2</sup> (Zavod za laserska i atomska istraživanja Instituta Ruđera Boškovića, Zagreb, Hrvatska)
- autoklav (Systec, Njemačka)
- naočale s filtrom
- miješalica (Kartell TK35)

### 3.2. 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin

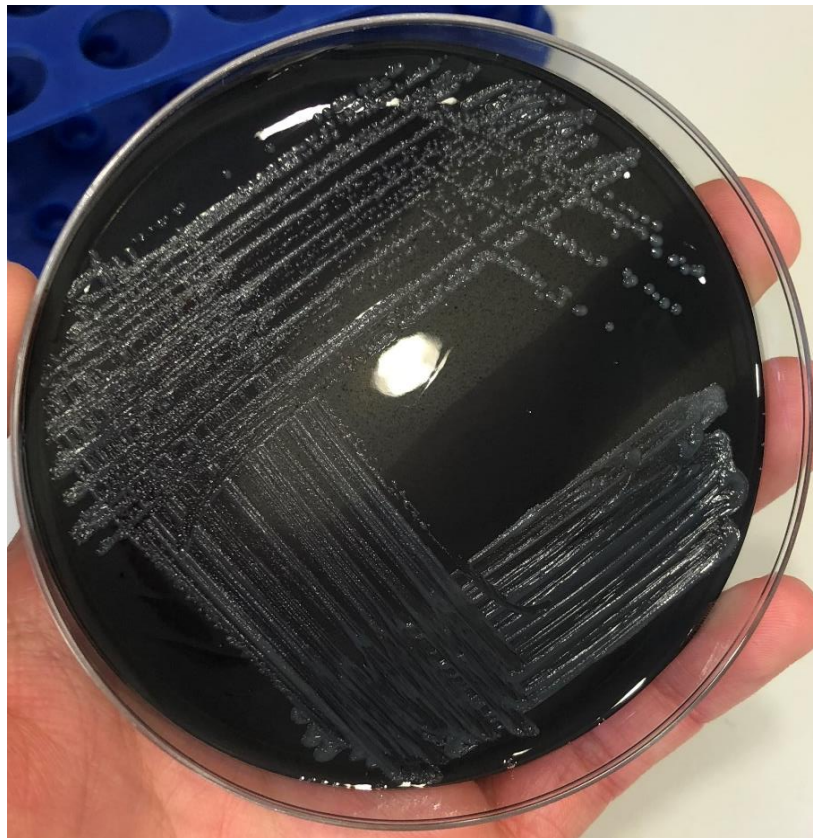
Spoj koji se koristio u izvedbi narednih eksperimenata je amfilni porfirin naziva 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirin, kratice TMPyP3-C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>, molarne mase M = 1048,64 g/mol. Spoj je pripremljen kao 200 μM otopina u vodi nakon čega je profiltrirana u novu staklenu epruvetu te je otopina čuvana u hladnjaku na +4 °C, u staklenoj epruveti omotanoj u aluminijsku foliju kako bi spoj štitila od svjetla.



Slika 6. Kemijska struktura 5-(4-oktadec-9-enamidofenil)-10,15,20-tris(3-piridil)porfirina (molarna masa = 1048,64 g/mol; molekulska formula: C<sub>62</sub>H<sub>69</sub>OCl<sub>3</sub>).

### 3.3. Bakterijski soj

U pokusima korištena je gram-negativna bakterija *Legionella pneumophila* soj 130b. Legionele su suspendirane u 10%-tnom glicerol bujonu. Suspenzija je zatim alikvotirana i zamrznuta na -80 °C. Nakon uzgoja 3 - 5 dana na BCYE podlozi pri 37 °C u atmosferi obogaćenoj 4 - 5 % CO<sub>2</sub>, bakterija se koristila u pokusima.



Slika 7. *Legionella pneumophila* na BCYE agaru 72 sata nakon nasađivanja.



### 3.4. Hranjiva podloga i medij

#### 3.4.1. Voda iz slavine

Voda iz slavine koja se koristila u eksperimentima autoklavirana je pri 121 °C, tijekom 15 minuta.

#### 3.4.2. BCYE agar

Priprema: u smjesu koju čine 10 g ACES-a (*N*-(2-Acetamido)-2-aminoetansulfonska kiselina), 10 g kvašćeva ekstrakta, 2 g aktivnog ugljena, 20 g agara te 1 g  $\alpha$ -ketoglutarata dodano je 900 mL sterilne destilirane vode nakon čega je pH vrijednost namještena na 6,9 pomoću 10 M KOH. Zatim je slijedilo autoklaviranje na 121 °C tijekom 15 minuta nakon čega je dodano 10 mL  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$  te 10 mL L-cisteina u obliku hidroklorid monohidrata.

Nakon što se pripremljeni agar ohladi na otprilike 50 °C, izlije se u Petrijevu zdjelicu pri čemu je debljina podloge 4 mm. BCYE agar čuva se u hladnjaku pri +4 °C.

### 3.5. Bakterijski inokulum

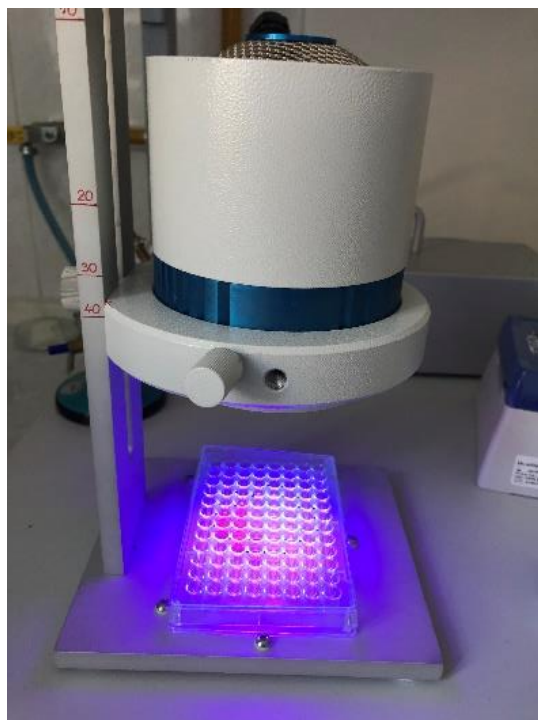
Broj bakterija određen je spektrofotometrijski. Optička gustoća namještena je na 1 što označava  $10^9$  CFU/mL (prema eng. *colony-forming unit*). Broj bakterija u inokulumu potvrđen je nasađivanjem deseterostrukih razrjeđenja na BCYE podlogu. Kao slijepa proba koristila sterilna voda iz slavine (optička gustoća iznosi 0). Zatim su napravljena razrjeđenja kako

bismo dobili  $10^6$  CFU/mL, a to je ujedno i koncentracija koja se koristila u svim eksperimentima .

### 3.6. Određivanje minimalne efektivne koncentracije dilucijskom metodom

MEK (minimalna efektivna koncentracija) ispitivana je u sterilnoj vodi iz slavine. Svi uzorci rađeni su u duplikatu.

U mikrotitrasku pločicu (ROLL, Piove di Sacco, Italija) dodano je 100  $\mu$ L sterilne vode, osim u drugi red gdje se nanio spoj. Multikanalnom pipetom nanoseno je 200  $\mu$ L spoja u drugi red. Nadalje, dvostruka razrjeđenja su se učinila prenašanjem 100  $\mu$ L spoja u iduće nizove jažica ispunjenih vodom uz resuspendiranje. U idućem koraku se u svaku jažicu dodalo 100  $\mu$ L bakterijske suspenzije koncentracije  $10^6$  CFU/mL. Kao negativna kontrola koristila se bakterijska suspenzija bez spoja. Za provjeru toksičnosti u mraku (prema eng. *dark toxicity*) se 100  $\mu$ L otopine iz svake jažice prenijelo na novu mikrotitrasku pločicu koja se nije izlagala svjetlu. Mikrotitarske pločice se zatim poklope, omotaju aluminijskom folijom te stave u tresilicu (Heidolph inkubator 1000, Njemačka) na 37 °C tijekom 30 minuta. Tijekom inkubacije u tresilici, upalila se LED lampa kako bi se stabilizirala. Nakon inkubacije jedna se mikrotitarska pločica premjestila ispod izvora svjetlosti intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup> tijekom 30 minuta. Također, učinjena su još dva eksperimenta utvrđivanja MEK-a tijekom različitih vremena inkubacije i izlaganja svjetlosti. U drugom eksperimentu se vršila 45-minutna inkubacija i 10-minutna izloženost svjetlu te u trećem 30-minutna inkubacija i 10-minutna izloženost svjetlu. Nakon osvjetljavanja i 24-satne inkubacije u inkubatoru, iz svake jažice s uzorkom uzeto je 10  $\mu$ L i nasađeno je na BCYE agar te se nakon 72 sata inkubacije očitavala minimalna efektivna koncentracija koja predstavlja najnižu koncentraciju ispitivanog spoja pri kojoj je uočen izostanak rasta bakterija u vodi.

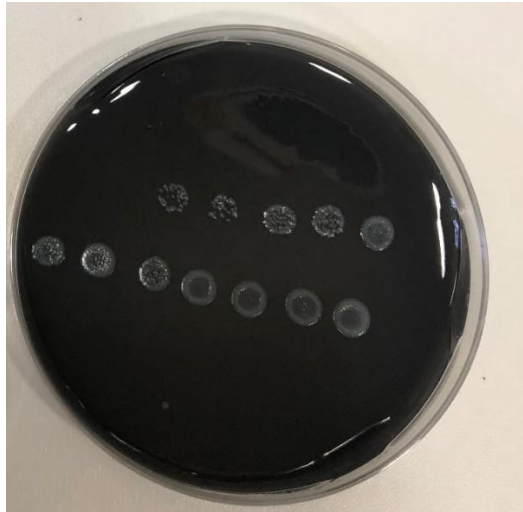


*Slika 8. Prikaz osvjetljavanja mikrotitarske pločice LED lampom valne duljine 394 nm i intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>.*

### 3.7. Anti-adhezija na polistiren

Ispitalo se djelovanje porfirina na stvaranje biofilma, tj. anti-adhezivno djelovanje spoja na polistiren.

Nakon pripreme serije dvostrukih razrjeđenja spoja i inkubacije 30 minuta i osvjetljavanja 10 minuta, bakterije su stavljene na inkubaciju tijekom 24 sata. Zatim su odstranjene neadherentne bakterije na način da su stanice dva puta isprane sterilnom vodom iz slavine. Mikrotitarske pločice su zatim stavljene u ultrazvučnu kupelj snage 200 W te frekvencije 40 kHz tijekom 1 minute. Nakon ultrazvuka se uzorak resuspendira te se pipetom uzme 10  $\mu$ L uzorka i nasadi na BCYE agar. Očitavanje rezultata izvršeno je nakon 72 sata. Isti postupak se proveo s mikrotitarskom pločicom koja nije izlagana svjetlosti.



*Slika 9. Primjer određivanja minimalne efektivne koncentracije.*

### 3.8. Test fotoinaktivacije

Pripremila se bakterijska suspenzija (u sterilnoj vodi iz slavine) koncentracije  $10^6$  CFU/mL te se 100  $\mu$ L bakterijske suspenzije dodalo u 100  $\mu$ L koncentracije spoja (2MEK-a, MEK te  $\frac{1}{2}$ MEK-a) nakon čega su se te suspenzije izložene svjetlosti intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>. Izloženost svjetlu trajala je 60 minuta te se u jednom eksperimentu svakih 10 minuta prenijelo 10  $\mu$ L uzorka na BCYE agar, dok se u drugom eksperimentu to činilo svakih 5 minuta.

## 4. Rezultati

### 4.1. Minimalna efektivna koncentracija ispitana dilucijskom metodom

Radi utvrđivanja vrijednosti MEK-a, provedeni su eksperimenti s različitim vremenima inkubacije u mraku i na svjetlu sa svježe pripremljenom otopinom, kao i otopinom spoja pripremljenom prije 2,5 mjeseca kako bi se utvrdile razlike u djelotvornosti istih. U svim se eksperimentima koristila sterilna voda iz slavine, *L. pneumophila* soj 130b te LED ljubičasta svjetlost valne duljine 394 nm i intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>.

#### 4.1.1. MEK vrijednost svježe otopine spoja

U prvom se eksperimentu vršila inkubacija u mraku na tresilici tijekom 30 minuta, a zatim je mikrotitarska pločica stavljena pod izvor svjetlosti 30 minuta. Nakon inkubacije na 37 °C tijekom 24 sata, nasađeni su svi uzorci na BCYE agar nakon čega je dobivena vrijednost MEK = 0,391 μM, a to je najniža vrijednost koja inhibira rast legionele.

*Tablica 1. Protumikrobni fotodinamički učinak svježe pripremljenog spoja nakon 30-minutne inkubacije u mraku i 30-minutne inkubacije pod svjetlom.*

<b>Kratica spoja</b>	<b>MEK/μM</b>
<b>TMPyP3-C<sub>17</sub>H<sub>33</sub></b>	0,391

#### 4.1.2. MEK vrijednost otopine spoja pripremljene prije 2,5 mjeseca

Proveli su se eksperimenti s različitim vremenima inkubacije u tresilici i pod svjetlom u kombinacijama: 1) 30 minuta tresilica + 30 minuta svjetlo, 2) 45 minuta tresilica + 10 minuta svjetlo i 3) 30 minuta tresilica + 10 minuta svjetlo. Za sva tri provedena eksperimenta vrijednost iznosi MEK = 0,195  $\mu$ M.

*Tablica 2. Protumikrobni fotodinamički učinak spoja pripremljenog prije 2,5 mjeseca tijekom različitih vremena inkubacije u tresilici i izlaganja svjetlu.*

<b>Broj eksperimenta + opis</b>	<b>Kratica spoja</b>	<b>MEK/<math>\mu</math>M</b>
<b>1) 30 min. inkubacija u tresilici + 30 min. svjetlo</b>	TMPyP3-C <sub>17</sub> H <sub>33</sub>	0,195
<b>2) 45 min. inkubacija u tresilici + 10 min. svjetlo</b>		
<b>3) 30 min. inkubacija u tresilici + 10 min. svjetlo</b>		

## 4.2. Određivanje minimalne efektivne koncentracije (toksičnost u mraku)

Kako bi se utvrdila minimalna efektivna koncentracija nakon djelovanja spoja u mraku, provedeni su eksperimenti s istim vremenom inkubacije u mraku (30 minuta) sa svježe pripremljenom i otopinom spoja pripremljenom prije 2,5 mjeseca. Kod otopine pripremljene prije 2,5 mjeseca ta koncentracija iznosi 25  $\mu\text{M}$ , a kod svježe pripremljene otopine 6,25  $\mu\text{M}$ .

*Tablica 3. Minimalne efektivne koncentracije dobivene testom toksičnosti u mraku sa svježe pripremljenom i otopinom spoja pripremljenom prije 2,5 mjeseca.*

<b>Starost otopine</b>	<b>Kratica spoja</b>	<b>MEK/<math>\mu\text{M}</math></b>
<b>Otopina pripremljena prije 2,5 mjeseca</b>	TMPyP3-C <sub>17</sub> H <sub>33</sub>	25,00
<b>Svježa otopina</b>		6,25

## 4.3. Određivanje koncentracije koja inhibira adheziju

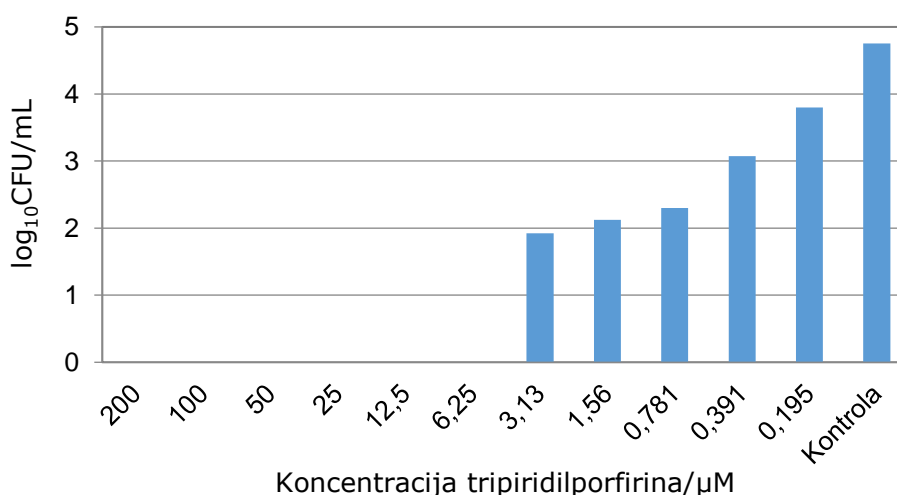
Svrha ovog eksperimenta je odrediti koncentraciju koja će inhibirati adheziju na polistiren, tj. koncentraciju koja će onemogućiti stvaranje biofilma. Nakon provedbe eksperimenata 4.1.1. te 4.2., proveo se postupak opisan u poglavlju 3.7. Eksperimenti su se provodili samo sa svježe pripremljenom otopinom spoja nakon izlaganja svjetlu gdje je anti-

adhezivna koncentracija iznosi 0,391  $\mu\text{M}$  i bez izlaganja svjetlu gdje koncentracija iznosi 0,781  $\mu\text{M}$  (test toksičnosti u mraku).

Tablica 4. Koncentracije koje inhibiraju adheziju utvrđenom nakon provedbe dvaju opisanih eksperimenata.

Kratak opis eksperimenta	Kratica spoja	Koncentracija koja inhibira adheziju na polistiren/ $\mu\text{M}$
30 min. inkubacija u mraku + 30 min. svjetlo + UTZ	TMPyP3-C <sub>17</sub> H <sub>33</sub>	0,391
30 min. inkubacija u mraku + UTZ		0,781

Na grafikonu ispod (Slika 10.) nalazi se broj bakterija nakon testova anti-adhezije. Uzeta je aritmetička sredina broja bakterija te je taj broj logaritmiran.



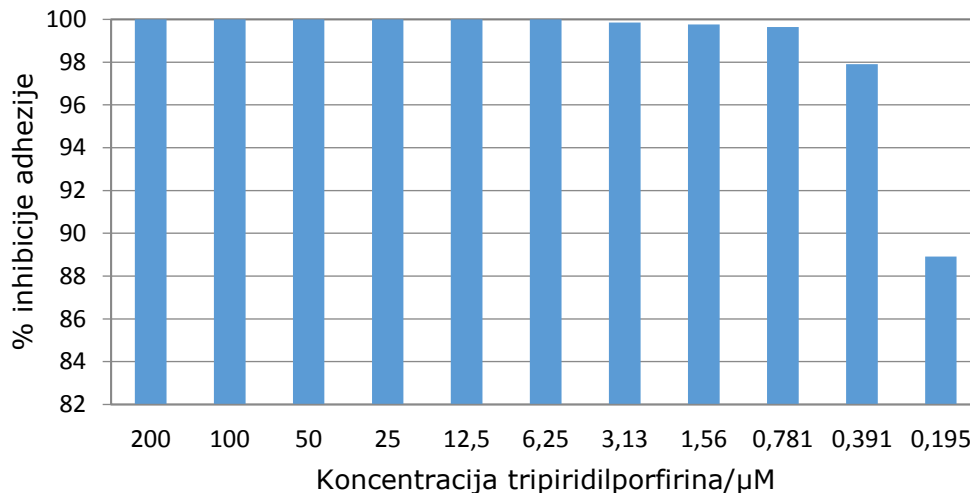
Slika 10. Grafički prikaz rezultata anti-adhezije.



Na Slici 11 određen je postotak inhibicije koji se dobije prema formuli

$$\% \text{ poraslih} = \frac{\text{broj bakterija uz određenu koncentraciju (srednja vrijednost)}}{\text{broj bakterija u kontroli (srednja vrijednost)}}, \text{ a } \% \text{ inhibicije} =$$

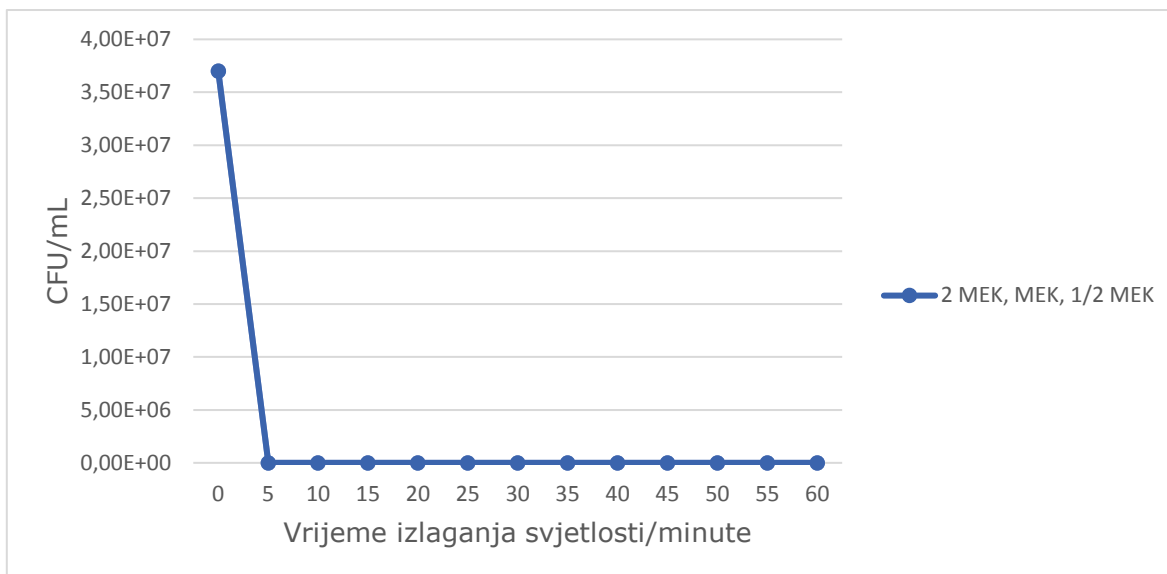
$$100\% - \% \text{ poraslih.}$$



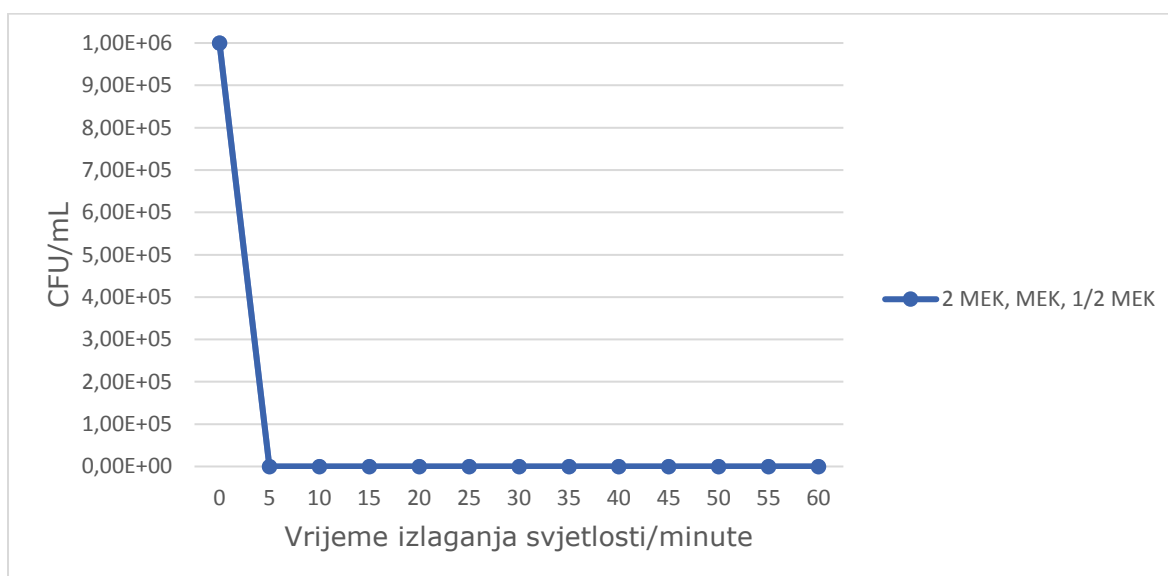
Slika 11. Grafički prikaz anti-adhezijskog učinka spoja na legionele u postocima.

#### 4.4. Test fotoinaktivacije

Test fotoinaktivacije učinio se sa svježe pripremljenom otopinom spoja te sa otopinom spoja pripremljenom prije 2,5 mjeseca tijekom sat vremena pod LED svjetlom valne duljine 394 nm te intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>. Eksperimenti su se ponovili dva puta. U prvoj seriji nasađivale su se koncentracije 2 MEK-a (0,781 μM), MEK (0,391 μM) i ½ MEK-a (0,195 μM) za svježe pripremljenu otopinu spoja te za otopinu spoja pripremljenu prije 2,5 mjeseca 2 MEK-a (0,391 μM), MEK (0,195 μM) i ½ MEK-a (0,098 μM) svakih 10 minuta, a u drugoj svakih pet minuta. U narednim tablicama prikazano je kako nakon 5-minutnog izlaganja svjetlu bakterije ne rastu niti na jednoj koncentraciji bez obzira na starost otopine spoja.



Slika 12. Grafički prikaz rezultata testa fotoinaktivacije na *L.pneumophili* soj 130b uz korištenu koncentraciju 2 MEK-a, MEK-a i 1/2 MEK-a svježe pripremljene otopine tijekom 60 minuta uz izlaganje ljubičastoj svjetlosti valne duljine 394 nm intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>.



Slika 13. Grafički prikaz rezultata testa fotoinaktivacije na *L.pneumophili* soj 130b uz korištenu koncentraciju 2 MEK-a, MEK-a i 1/2 MEK-a otopine pripremljene prije 2,5 mjeseca tijekom 60 minuta uz izlaganje ljubičastoj svjetlosti valne duljine 394 nm intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>.

## 5. Rasprava

Ispitivani spoj, čija su se protumikrobna svojstva istraživala, pripada amfifilnim porfirinima, što znači da ima hidrofilni i hidrofobni (lipofilni), odnosno polarni i nepolarni dio. Upravo bi amfifilno svojstvo trebalo omogućiti vezanje i prolazak kroz membranu te s druge strane topljivost u polarnim otapalima, primjerice u vodi. Očekuje se učinak na *L. pneumophila* pošto pozitivan naboj molekule omogućuje topljivost te interakciju s negativno nabijenim LPS-om na površini membrane, dok njen hidrofobni dio omogućuje prodor kroz fosfolipidni dvosloj.

Kao osnova za izvođenje daljnjih eksperimenata, odredila se minimalna efektivna koncentracija svježe pripremljene otopine i otopine pripremljene prije 2,5 mjeseca s različitim vremenima inkubacije pod ljubičastim svjetlom intenziteta 40 mW/cm<sup>2</sup>. MEK vrijednost svježe pripremljenog spoja nakon 30-minutne inkubacije pod svjetlom iznosi  $MEK_s = 0,391 \mu M$ , a MEK vrijednost spoja pripremljenog prije 2,5 mjeseca nakon 10-, 30- i 45-minutnog izlaganja svjetlu iznosi  $MEK_{2,5} = 0,195 \mu M$ .

Kod testa toksičnosti u mraku pokazalo se da je spoj aktivan i u mraku, ali puno slabije u odnosu nakon izlaganja svjetlu. Minimalne efektivne koncentracije iznose  $MEK_s = 6,25 \mu M$  i  $MEK_{2,5} = 25,00 \mu M$ . Pošto ispitivani spoj ukazuje na toksičnost bez izlaganja svjetlu, mogao bi imati neželjene učinke na čovjeka ukoliko bi se pokušao primijeniti na ljude, osobito kod oralne primjene.

Test anti-adhezije izvršio se samo sa svježe pripremljenom otopinom spoja te minimalna efektivna koncentracija nakon izlaganja svjetlu iznosi  $MEK_s = 0,391 \mu M$ , a bez izlaganja svjetlu iznosi  $MEK_s = 0,781 \mu M$ .

Iz navedenih rezultata proizlazi da je spoj aktivan i bez izlaganja svjetlu te kako se kod otopine pripremljene prije 2,5 mjeseca vrijednost MEK-a neznatno povećala, a toksičnost u mraku smanjila što bi značilo kako bi se u potencijalnoj primjeni kod čovjeka koristila otopina spoja ranije

pripremljena, a za dezinfekciju vode svježe pripremljena otopina. U testu anti-adhezije pokazalo se kako prilikom izlaganja svjetlu spoj ima jače djelovanje protiv stvaranja biofilmova te kao takav predstavlja potencijalni fotosenzibilizator u dezinfekciji vode.

Ispitivani spoj ima veliki potencijal u fotodinamičkoj inaktivaciji *L. pneumophile* jer već nakon 5 minuta bez obzira na starost otopine spoja i pri koncentracijama 2 MEK-a, MEK i ½ MEK-a nije zamijećen rast bakterija na agaru.

Kako vrijeme prolazi, radi se sve više istraživanja u području fotodinamičke inaktivacije zbog sve većeg broja bakterija rezistentnih na postojeće protumikrobne lijekove. Najčešći porfirinski fotosenzibilizatori koji se najčešće ispituju su tri- i tetrakationski pošto su se pokazali najučinkovitijima zahvaljujući većem broju pozitivnih naboja.

U istraživanju učinka svjetla, bez prisustva PS-a, na *L. rubrilucens* koristila se svjetlost valne duljine 405 nm intenziteta  $9,4 \pm 0,3$  mW/cm<sup>2</sup> tijekom 3 sata i 40 minuta (ukupna doza svjetla: 125 J/cm<sup>2</sup>). Navedeni način izlaganja svjetlu doveo je do redukcije bakterija za 10<sup>5</sup> CFU/mL. Međutim, važno je napomenuti kako legionele imaju sposobnost fotoreaktivacije nakon izlaganja UV svjetlosti koristeći enzim fotolijazu (prema eng. *photolyase*) koji vrši monomerizaciju pirimidinskih dimera uzrokovanih zračenjem [22, 24].

Nadalje, istraživao se fotoinaktivacijski učinak hidrofilnog porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me na biofilm i planktonske stanice (prema eng. *planktonic cells*) G- bakterije *P. aeruginose* i G+ bakterije *S. aureusa*. Potpuna eradikacija planktonskih stanica *S. aureusa* zabilježena je nakon izlaganja bijeloj svjetlosti intenziteta 40 W/m<sup>2</sup> tijekom 60 minuta pri koncentracijama spoja od 5, 10 i 20 µM. Međutim, potpuna eradikacija biofilma nije zabilježena, već redukcija za 10<sup>6,3</sup> CFU/mL nakon 270-minutnog izlaganja. U slučaju *P. aeruginose* potpuna eradikacija zabilježena je nakon 180-minutnog izlaganja bijeloj svjetlosti pri koncentracijama spoja od 10 i 20 µM, a u

slučaju biofilma nije zabilježena eradikacija, već samo redukcija bakterija za  $10^{2,8}$  CFU/mL [28].

U istraživanju fotodinamičke inaktivacije smjese bakterija (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* i *S. aureus*) u bolničkoj otpadnoj vodi koristila se 5  $\mu$ M otopina hidrofilnog tetrakationskog Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Nakon 270-minutnog izlaganja bijelom svjetlu intenziteta 40 W/m<sup>2</sup> nije zabilježena eradikacija, već redukcija za  $10^{6,5}$  CFU/mL [29].

U istraživanju učinka naboja na eradikaciju *E. coli* pokazalo se kako je najučinkovitiji trikationski Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF koji dovodi do potpune eradikacije nakon 90-minutnog izlaganja svjetlu. Drugi po učinkovitosti je tetrakationski Tetra-Py<sup>+</sup>-Me koji uzrokuje potpunu eradikaciju nakon 180 min. Monokationski Mono-Py<sup>+</sup>-Me-Tri-PF ne pokazuje nikakav učinak. U istraživanju su se koristile 5  $\mu$ M otopine spojeva te bijela svjetlost intenziteta 40 W/m<sup>2</sup> [30].

Uspoređujući vlastite rezultate s navedenim literaturnim, proizlazi kako se najbolji učinak postiže prilikom korištenja svjetlosti i amfifilnog trikationskog porfirina kao fotosenzibilizatora u kombinaciji. Također, ispostavlja se da jači intenzitet svjetlosti ima bolji učinak u fotodinamičkoj inaktivaciji.

## 6. Zaključci

- Ispitani amfifilni porfirin pokazuje jaču djelotvornost na svjetlu, u odnosu na djelotvornost u mraku
- Minimalna efektivna koncentracija koja inhibira rast bakterija jednaka je minimalnoj efektivnoj koncentraciji koja djeluje anti-adhezivno ukoliko je spoj izlagan svjetlosti
- Pokazano je da spoj inhibira adheziju bakterija > 99 % iznad koncentracije 0,391  $\mu\text{M}$
- Kod otopine spoja pripremljene prije 2,5 mjeseca vrijednost MEK se neznatno povećala, ali se toksičnost u mraku značajno smanjila
- Bez obzira na starost otopine spoja, prilikom 5-minutne izloženosti svjetlu u eksperimentu fotoinaktivacije dolazi do potpune eradikacije *L. pneumophila* i radi toga ovaj porfirin može postati potencijalni fotosenzibilizator za primjenu u dezinfekciji vode

## 7. Literatura

1. Michael T. Madigan, John M. Martinko KS, Bender DHB & DAS (2015) Brock Biology of Microorganisms, 14th ed. Pearson Education, San Francisco
2. Kalenić S i suradnici (2013) Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb
3. Malatesti N, Munitic I, Jurak I (2017) Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. *Biophys Rev* 9:149–168 . doi: 10.1007/s12551-017-0257-7
4. O’Riordan K, Akilov OE, Hasan T (2005) The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2:247–262 . doi: 10.1016/S1572-1000(05)00099-2
5. Bergamini G, Silvi S (2016) Applied Photochemistry. Springer
6. Pereira Rosa L (2014) Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections. *J Med Microbiol Diagnosis* 03: . doi: 10.4172/2161-0703.1000158
7. Nyokong T, Ahsen V (2012) Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security
8. McKendrick KG (1989) Principles and Applications of Photochemistry
9. St. Denis TG, Dai T, Izikson L, et al (2011) All you need is light, antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence* 2:509–520 . doi: 10.4161/viru.2.6.17889
10. Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR (2013) Antimicrobial Photodynamic Therapy to Kill Gram-negative Bacteria. *Recent Pat*

Antiinfect Drug Discov 8:1–23 . doi:  
10.2174/1574891X113089990012

11. Boyle RW, Dolphin D (1996) Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 64:469–485
12. Josefsen LB, Boyle RW (2008) Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs 2008*: . doi: 10.1155/2008/276109
13. Josefsen LB, Boyle RW (2012) Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics* 2:916–966
14. Ergaieg K, Seux R (2009) A comparative study of the photoinactivation of bacteria by meso-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and methylene blue. *Desalination* 246:353–362 . doi: 10.1016/j.desal.2008.03.060
15. Giovannetti R (2012) The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. In: *Macro To Nano Spectroscopy*
16. Odak I, Škorić I (2017) *Organska fotokemija - principi i primjena*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
17. Brancalion L, Moseley H (2002) Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 17:173–186 . doi: 10.1007/s101030200027
18. Hamblin MR, Hasan T (2014) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 3:436–50 . doi: 10.1039/b311900a.Photodynamic
19. Alves E, Costa L, Carvalho CM, et al (2009) Charge effect on the photoinactivation of gram-negative and gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol* 9:1–13 . doi: 10.1186/1471-2180-9-70



20. Jori G, Brown SB (2004) Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci* 3:403–405 . doi: 10.1039/b311904c
21. Dosselli R, Millionsi R, Puricelli L, et al (2012) Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach. *J Proteomics* 77:329–343 . doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.007
22. Schmid J, Hoenes K, Rath M, et al (2017) Photoinactivation of *Legionella rubrilucens* by visible light. *Eur J Microbiol Immunol* 7:146–149 . doi: 10.1556/1886.2017.00006
23. Andreozzi E, Di Cesare A, Sabatini L, et al (2014) Role of Biofilm in Protection of the Replicative Form of *Legionella pneumophila*. *Curr Microbiol* 69:769–774 . doi: 10.1007/s00284-014-0648-y
24. Knudson GB (1985) Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol* 49:975–980
25. Kuznetsova N a., Kaliya OL (2015) Photodynamic water disinfection. *Russ J Gen Chem* 85:321–332 . doi: 10.1134/S1070363215010466
26. Neu HC (1992) The crisis in Antibiotic resistance BT - *Science*. 257:1064–1073
27. Piddock LJ V (2012) The crisis of no new antibiotics-what is the way forward? *Lancet Infect Dis* 12:249–253 . doi: 10.1016/S1473-3099(11)70316-4
28. Beirão S, Fernandes S, Coelho J, et al (2014) Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol* 90:1387–1396 . doi: 10.1111/php.12331
29. Almeida J, Tomé JPC, Neves MGPMS, et al (2014) Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: Influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiol Sci* 13:626–633

. doi: 10.1039/c3pp50195g

30. Simões C, Gomes MC, Neves MGPMS, et al (2016) Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins - The charge number and charge distribution effects. *Catal Today* 266:197–204 . doi: 10.1016/j.cattod.2015.07.031

## Zahvale

Osobno se zahvaljujem mentorici doc .dr. sc. Neli Malatesti i izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin na omogućavanju pisanja i izrade eksperimentalnog dijela završnog rada. Također bih se zahvalio i bacc. med. lab. ing. Gabrijeli Begić na pomoći oko materijala. Ovom mogućnošću uvele su me u svijet znanosti i podučile znanstvenom izražavanju te provedbi eksperimenata u području fotodinamičke inaktivacije.

U radu je korištena oprema projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR).

## 8. Životopis



### Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE **Peradinović**

**Josip**

Frlanska cesta 10, 51211 Matulji (Hrvatska)

+385957424271



peradinovic.1996@gmail.com

### RADNO

#### ISKUSTVO

01. srpnja 2015.–01. kolovoza 2015. **Održavanje okoliša**  
Villa Ventura, Medvidići (Hrvatska)

01. svibnja 2016.–01. listopada 2016. **Održavanje okoliša**  
Villa Ventura, Medvidići (Hrvatska)

01. srpnja 2017.–01. listopada 2017. Apartmani Ventura, Rijeka (Hrvatska)

#### OBRAZOVANJE I

▪ dočekivanje i otpremanje gostiju

#### OSPOSOBLJAVANJE

2003.–2011. **Niža stručna sprema**  
Osnovna škola Dr. Andrije Mohorovičića, Matulji (Hrvatska)

2011.–2015. **Srednja stručna sprema**  
Gimnazija Eugena Kumičića, Opatija (Hrvatska)

2015.–2018. **Viša stručna sprema**  
Odjel za biotehnologiju, Rijeka (Hrvatska)

#### OSOBNJE

#### VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici engleski

Komunikacijske vještine apartmanu

- unaprjeđenje vještina prilikom komunikacije s ljudima tijekom rada u apartmanu

Digitalne

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

Digitalne vještine - Tablica za samoprocjenu

- iskustvo rada u programima MS Word, PowerPoint i Excel, PyMol, Chimera, ChemAxon Marvin, Avogadro i GAMESS.

31/8/18

© Europska unija, 2002-2018 | <http://europass.cedefop.europa.eu>

Stranica 1 / 3



Životopis

Peradinović Josip

Vozačka dozvola B  
DODATNE

INFORMACIJE

**Volontiranje u Laboratoriju za prirodne spojeve i metabolomiku Odjela za biotehnologiju**

11. srpnja 2016. - 22. srpnja 2016.

- metoda određivanja ukupnih lipida po Folchu
- homogenizacija tkiva
- uparivanje na rotavaporu
- centrifugiranje
- plinska kromatografija

06. rujna 2016. - 27. rujna 2016.

- BCA metoda određivanja proteina
- spektrofotometrija u određivanju koncentracije proteina
- SDS-PAGE
- priprema puferских otopina
- Western blot

01. srpnja 2017. - 01. listopada 2017.

- priprema puferских otopina

- priprema uzoraka za SDS-PAGE
- priprema gelova za SDS-PAGE

#### **Otvoreni dan Odjela za biotehnologiju**

- 2017. (mikroskopiranje)
- 2018. (mikroskopiranje)

**Članstva** ▪ Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci

**Radionice/Seminari** **Ožujak 2018.**

- trodnevna Zimska škola znanstvenog pisanja, voditelj: Filip Đerke

**Svibanj 2018.**

- Seminar financijske pismenosti

[Vezani dokument\(i\): Josip\\_Peradinović\\_Potvrda\\_OZI.pdf](#)

#### **PRILOZI**

---

- Josip\_Peradinović\_Potvrda\_OZI.  
pdf

## Josip\_Peradinović\_Potvrda\_OZI.pdf

