

Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela u biofilmu

Ćavar, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:193:463474>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

BIotech

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Iva Čavar

Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela u biofilmu

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Iva Ćavar

Porfirini u fotodinamičkoj inaktivaciji legionela u biofilmu

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Ko-mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
Medicinal chemistry

Iva Ćavar

Porphyrins in photodynamic inactivation of *Legionella* in biofilm

Master's thesis

Rijeka, 2021

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Ko-mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Diplomski rad je obranjen dana 15.10.2021.

Pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Željka Maglica
2. Doc. dr. sc. Mateja Ožanič
3. Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin
4. Izv. prof. dr. sc. Nela Malatesti

Rad ima 58 stranica, 23 slike, 1 tablicu i 46 literaturnih navoda.

Sažetak

Bakterija *Legionella pneumophila* često nastanjuje umjetno stvorene sustave voda i izaziva respiratorne bolesti. *L. pneumophila* u kontaminiranim sustavima stvara biofilm što povećava rezistenciju bakterija na metode dezinfekcije vode koje se najčešće koriste kao što su: termička obrada, kloriranje, dezinfekcija UV zračenjem i ozonom. Fotodinamička inaktivacija jedna je od potencijalnih metoda za dezinfekciju voda, a antimikrobni učinak postiže se kombinacijom netoksičnih komponenti: fotosenzibilizatora, kisika i svjetlosti. U ovome radu korištena su tri kationska porfirinska fotosenzibilizatora, amfifilni spoj TMPyP3-C₁₇H₃₅ i dva hidrofilna spoja TMPyP3-CH₃ i TMPyP3. Kao izvor svjetlosti korištena je LED lampa koja emitira ljubičastu svjetlost. Cilj ovoga rada bio je odrediti minimalne efektivne koncentracije spojeva te ispitati anti-adhezijska i anti-biofilm svojstva fotosenzibilizatora u vodama prirodnog podrijetla različite tvrdoće. Sva tri fotosenzibilizatora bila su učinkovita u inhibiciji adhezije *L. pneumophila* na polistiren i formiranju biofilma u koncentracijama koje odgovaraju MEK vrijednostima od 0,25×MEK i 0,5×MEK u mekoj vodi. U demineraliziranoj vodi zamijećena je najveća toksičnost u mraku i najbolja učinkovitost fotodinamičke inaktivacije pa je moguće da je koncentracija otopljenih iona u vodi, odnosno tvrdoća vode, mogla utjecati na učinkovitost fotodinamičke inaktivacije.

Ključne riječi: *Legionella pneumophila*, dezinfekcija vode, biofilm, porfirini, kationski fotosenzibilizatori, tvrdoća vode, fotodinamička inaktivacija

Summary

The bacterium *Legionella pneumophila* commonly inhabits artificially made water systems and causes respiratory illnesses. In contaminated systems, *L. pneumophila* forms biofilm which increases bacterial resistance to most commonly used methods for water disinfection such as thermal processing, chlorination, disinfection by UV radiation and ozone. Photodynamic inactivation is one of the potential methods for water disinfection and its antimicrobial effect is achieved by combining nontoxic components: photosensitizers, oxygen, and light. In this research three cationic porphyrinic photosensitizers were used, amphiphilic compound TMPyP3-C₁₇H₃₅ and two hydrophilic compounds TMPyP3-CH₃ and TMPyP3. LED lamp that emits purple light was used as the light source. The focus of this thesis was to determine the minimal effective concentration of photosensitizers and to test the anti-adhesion and anti-biofilm properties of photosensitizers in waters of natural origin and different water hardness. All three photosensitizers were efficient in inhibiting the adhesion of *L. pneumophila* to polystyrene and against the formation of biofilm in concentrations that correspond to MEK values of 0.25×MEK and 0.5×MEK in soft water. The highest dark toxicity and the best efficiency of photodynamic inactivation were observed in demineralized water which suggests that concentration of dissolved ions in water i.e., water hardness, could have affected the efficiency of photodynamic inactivation.

Keywords: *Legionella pneumophila*, water disinfection, biofilm, porphyrins, cationic photosensitizers, water hardness, photodynamic inactivation

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Mehanizam fotodinamičke inaktivacije (PDI)	2
1.2. Fotosenzibilizatori i izvori svjetlosti	4
1.2.1. Izvori svjetlosti	8
1.3. Antimikrobna fotodinamička terapija	9
1.4. <i>Legionella pneumophila</i>	11
1.5. Bakterijski biofilm	15
1.6. <i>Legionella pneumophila</i> biofilm	17
2. CILJ RADA	21
3. MATERIJALI I METODE	22
3.1. Korišteni pribor i uređaji	22
3.2. Korišteni spojevi	23
3.3. Bakterijski soj	25
3.4. BCYE agar (eng. <i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>)	25
3.5. Uzorci voda različitih tvrdoća	26
3.6. Bakterijski inokulum	26
3.7. Određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) fotosenzibilizatora mikrodilucijskom metodom u uzorcima voda različitih tvrdoća	27
3.8. Ispitivanje anti-adhezijskih svojstava fotosenzibilizatora u uzorcima voda različitih tvrdoća	30
3.9. Ispitivanje anti-biofilm svojstava fotosenzibilizatora u uzorcima voda različitih tvrdoća	32

3.10. Statistička obrada podataka	33
4. REZULTATI	34
4.1. Minimalna efektivna koncentracija (MEK) u vodama različitih tvrdoća	34
4.2. Anti-adhezijska svojstva fotosenzibilizatora (PS) u uzorcima voda različitih tvrdoća	35
4.3. Anti-biofilm svojstva fotosenzibilizatora (PS) u uzorcima voda različitih tvrdoća	39
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA	50
8. ŽIVOTOPIS.....	56

1. UVOD

Gram-negativna bakterija *Legionella pneumophila* jedna je od preko 60 vrsta bakterija koje spadaju u porodicu *Legionellaceae*, a izaziva preko 90% humanih infekcija. *L. pneumophila* nastanjuje vlažna područja pa se često nalazi u umjetno stvorenim sustavima za grijanje i hlađenje vode, uređajima za klimatizaciju prostora i objektima gdje se nalaze spremnici vode (hoteli, bolnice, starački domovi, toplice), a poseban rizik predstavljaju objekti koji se otvaraju sezonski nakon dugog perioda nekorištenja [1]. U takvim sustavima *L. pneumophila* se organizira u biofilm koji otežava eradikaciju jer su bakterije u biofilmu otpornije na kloriranje i ostala biocidna sredstva te se patogenost *L. pneumophila* povećava u biofilmu [2]. Okolišni uvjeti kao što su temperatura, vrsta materijala na kojemu se stvara biofilm, prisutnost dvovalentnih kationa i dr. imaju utjecaj na formaciju biofilma [3]. Zbog toga je u ovome radu prezentirano istraživanje o učinku tvrdoće vode na fotodinamičku inaktivaciju bakterije *L. pneumophila* čiji su rezultati objavljeni u radu [4].

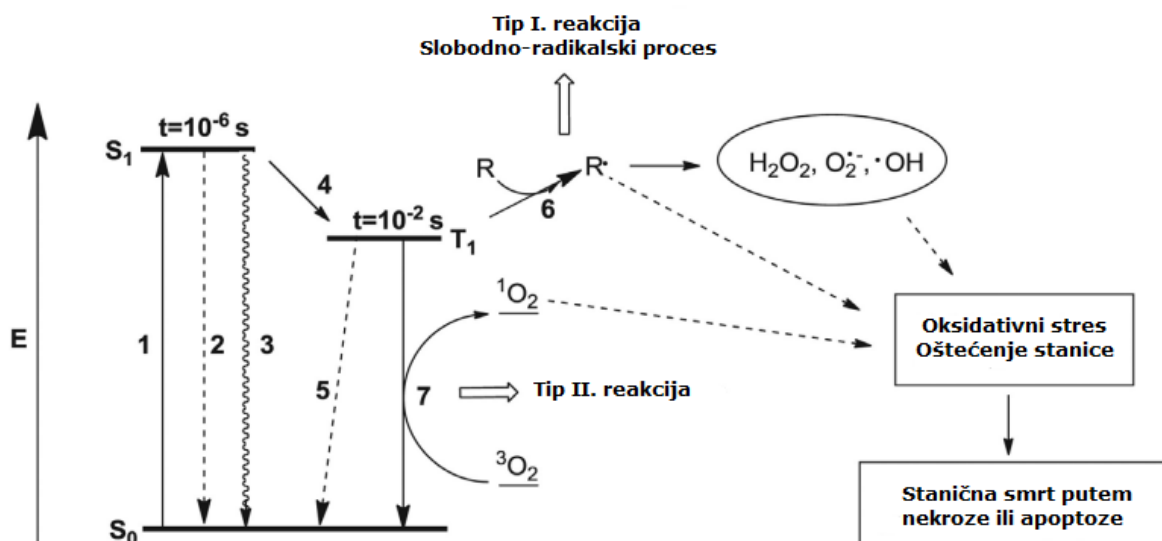
Fotodinamička inaktivacija, u literaturi se može naći i pod nazivom antimikrobna fotodinamička terapija (aPDT, skraćeno od eng. *antimicrobial photodynamic therapy*), kombinira netoksične komponente: kisik, fotosenzibilizator (PS) i svjetlost koje nakon fotoaktivacije fotosenzibilizatora izazivaju oksidativni stres i citotoksično djeluju na ciljne stanice [5], [6]. Fotodinamička inaktivacija već je našla svoju primjenu u klinici, za liječenje onkoloških i neonkoloških oboljenja [7], [8]. Osim liječenja onkoloških i neonkoloških oboljenja fotodinamička inaktivacija mogla bi se koristiti umjesto pesticida, za razvijanje materijala koji inhibiraju rast mikroorganizama pa i za dezinfekciju voda [9].

1.1. Mehanizam fotodinamičke inaktivacije (PDI)

Fotodinamička inaktivacija (PDI) klinički je odobren način tretiranja kojemu su za uspješan tretman potrebni kisik, izvor svjetlosti i fotosenzibilizator (PS) kako bi se stvorile reaktivne kisikove vrste (ROS eng. *reactive oxygen species*), većinom singletni kisik $^1\text{O}_2$, a rezultat nastanka reaktivnih kisikovih vrsta je citotoksični učinak protiv raznih patogena i tumorskih stanica [5]. Nakon što PS uđe u ciljnu stanicu, osvjetljava se izvorom svjetlosti određene valne duljine koja se poklapa s apsorpcijskim spektrom PS-a te PS prelazi iz osnovnog singletnog stanja (S_0) u pobuđeno singletno stanje (S_n) zato što dolazi do prelaska elektrona iz energetski niže razine u energetski višu razinu bez promjene spina [10], [11]. PS koji se nalazi u pobuđenom singletnom stanju može se vratiti u osnovno singletno stanje tako da apsorbiranu energiju emitira u procesima vibracijskog opuštanja (oslobađanje energije u obliku topline) i fluorescencije (oslobađanje energije u obliku svjetlosti). PS koji se nalazi u pobuđenom singletnom stanju može prijeći u pobuđeno tripletno stanje (T_n) u spinski zabranjenom procesu kod kojega dolazi do obrtanja spina i koji se naziva međusustavno križanje (ISC eng. *intersystem crossing*) [11]. Pobuđeno tripletno stanje je odgovarajući oblik fotosenzibilizatora za terapiju jer ima dulji poluživot od PS-a koji se nalazi u pobuđenom singletnom stanju (ns-ps) [10], [11]. PS se i iz pobuđenog tripletnog stanja može vratiti u osnovno singletno stanje tako da apsorbiranu energiju oslobađa u procesu zvanom fosforescencija. Nakon što je PS preveden u pobuđeno tripletno stanje, može sudjelovati u dva tipa fotokemijskih reakcija.

U reakcijama tipa I PS u pobuđenom tripletnom stanju može izravno reagirati sa supstratima u stanici (biomolekule) tako da dolazi do prijenosa protona ili elektrona kako bi nastali radikalski anioni ili kationi. Nastali radikalski anioni i kationi mogu reagirati s kisikom koji je otopljen u citoplazmi stanica kako bi nastale reaktivne kisikove vrste kao što su superoksidni

radikal-anion, vodikov peroksid i hidroksilni radikal [12]. U reakcijama tipa II dolazi do prijenosa energije s PS-a u pobuđenom tripletnom stanju na molekularni kisik.



Slika 1. Dijagram Jablonskog prilagođen iz [13]. 1 – apsorpcija, 2 – fluorescencija, 3 – unutarnja pretvorba (IC eng. *internal conversion*), 4 - međusustavno križanje (ISC eng. *intersystem crossing*), 5 – fosforescencija, 6 – formiranje slobodnih radikala nakon interakcije PS-a u pobuđenom tripletnom stanju (T_1) i supstrata (R), 7 – stvaranje singletnog kisika, S_0 – osnovno singletno stanje, S_1 – prvo pobuđeno singletno stanje

Molekularni kisik u svom osnovnom energetskom stanju se nalazi u tripletnom stanju 3O_2 zbog čega je moguć izravan prijenos energije s PS-a u pobuđenom tripletnom stanju na molekularni kisik u osnovnom tripletnom stanju. Budući da se većina organskih molekula nalazi u osnovnom singletnom stanju, a kisik u osnovnom tripletnom stanju, pobuđeni PS ne oštećuje stanične komponente stupajući s njima u interakciju već reagira s kisikom i u toj reakciji nastaje singletni kisik 1O_2 koji ima izrazita oksidacijska svojstva [10]. Budući da je singletni kisik jako reaktivan i ima izrazito kratak poluživot i radijus djelovanja (u biološkim sustavima <40 ns, 20 nm) može oštetiti samo molekule u svojoj neposrednoj blizini zbog čega lokalizacija PS-a može utjecati na ishod PDI-e [12]. Pretpostavlja se da reakcije tipa II imaju važniju ulogu u

učinkovitosti PDI-e, ali omjeri u kojima reakcije oba tipa doprinose učinkovitosti ovisi o mnogim čimbenicima od kojih su neki: pH, struktura PS-a, koncentracija kisika. Kako se troši dostupan kisik, tako reakcije tipa I počinju prevladavati. Oštećenja mitohondrija iniciraju apoptozu, oštećenja lizosoma autofagiju, a oštećenja stanične membrane i gubitak integriteta uzrokuje nekrozu [10]. Opisani fotofizikalni i fotokemijski procesi shematski su prikazani dijagramom Jablonskog (Slika 1.)

1.2. Fotosenzibilizatori i izvori svjetlosti

Fotosenzibilizatori su prirodni ili sintetički spojevi koji prenose svjetlosnu energiju i koji obično nisu toksični bez prisutnosti svjetlosti [14], [15]. Makrociklički spojevi kao što su naftalocijanini, ftalocijanini, bakterioklorini, klorini, porfirini i dr. koriste se u dijagnostici i liječenju. Ti spojevi nakon izlaganja svjetlosti određene valne duljine mogu izazvati oksidativna oštećenja ciljnih stanica i tako dovesti do stanične smrti. Zbog svoje sposobnosti stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta nakon izlaganja izvoru svjetlosti postali su važan dio fotodinamičke inaktivacije [11].

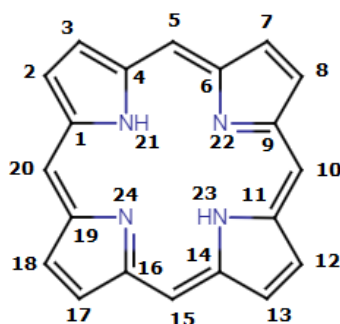
Idealan fotosenzibilizator trebao bi posjedovati određene karakteristike kao što su: visok stupanj kemijske čistoće i poznat specifični sastav, određena kemijska struktura, minimalna toksičnost u mraku, citotoksična aktivnost prisutna samo nakon izlaganja izvoru svjetlosti jasno definirane valne duljine, stabilnost pri sobnoj temperaturi, izvrsna fotokemijska aktivnost tj. visok doprinos pobuđenog tripletnog stanja i dovoljno dug poluživot pobuđenog tripletnog stanja kako bi fotosenzibilizator stupio u interakcije i stvorio singletni kisik i reaktivne kisikove vrste, bez mutagenih ili kancerogenih učinaka, dobra topljivost u vodi i optimalna lipofilnost, visok afinitet vezanja za specifične mikroorganizme, lokalizacija u blizini staničnih organela koji su najosjetljiviji na fotodinamičku štetu, lagana i izravna sinteza, financijska isplativost i komercijalna dostupnost [13], [16], [6].

Fotosenzibilizatori mogu biti kategorizirani na razne načine od kojih nijedan nije potpun. Prva od podjela je podjela prema generacijama u kojoj su fotosenzibilizatori svrstani u tri generacije. Fotosenzibilizatori prve generacije su derivati hematoporfirina (HpD), u vodi topljive mješavine porfirina, koji su dobiveni pročišćavanjem i kemijskim modifikacijama prvog porfirina korištenog kao fotosenzibilizator – hematoporfirina. Za razliku od hematoporfirina, derivati hematoporfirina bili su selektivniji za tkiva tumora i imali su manji fotosenzitivirajući potencijal na koži. Smjesa izoliranih porfirinskih dimera i oligomera poznata pod imenom „Photofrin“ i danas je najčešće korišten fotosenzibilizator. Njegova klinička primjena ograničena je zbog niske kemijske čistoće (smjesa je više od 60 molekula), slabe penetracije u tkiva, dugog poluvremena i visoke akumulacije u koži zbog čega se javlja preosjetljivost kože. Zbog navedenih nedostataka potaknuto je razvijanje druge generacije fotosenzibilizatora koju čine derivati hematoporfirina i sintetički fotosenzibilizatori kao što su 5-aminolevulinska kiselina, derivati benzoporfirina, teksafirini, klorini, tiopurinski derivati, analozi bakterioklorina i ftalocijanina, porfirini, derivati klorofila i boje. Fotosenzibilizatori druge generacije karakteristični su po visokoj kemijskoj čistoći, visokom doprinosu singletnog kisika i boljoj penetraciji, manje nuspojave zbog brže eliminacije i bolje lokalizacije u tumorskim tkivima. Nedostatak ovih fotosenzibilizatora je slaba topljivost u vodi. Kako bi se povećao afinitet fotosenzibilizatora za ciljne stanice razvila se treća generacija fotosenzibilizatora tako što su kombinirani fotosenzibilizatori druge generacije s: molekulama koje ciljaju receptore na ciljnim stanicama, LDL lipoproteinom, monoklonalnim protutijelima koja ciljaju specifični antigen na ciljnoj stanici i dr. Često se smatra da su novije generacije bolje od starih, ali u kliničkoj praksi nikada nije napravljena usporedba kako bi dokazala ili pobila tu tvrdnju, a fotosenzibilizatori druge i treće generacije često nisu komercijalno dostupni [10], [17]. Nadalje, fotosenzibilizatori se mogu podijeliti prema sintetičkoj čistoći koja nalaže da

fotosenzibilizatori kao Photophrin® nisu dobri kao čiste tvari zbog toga što su mješavine molekula. Ova stavka bitna je farmaceutskim tvrtkama od kojih se traži čistoća tvari u proizvodnji lijeka da bi dobio odobrenje, ali u kliničkoj praksi se i dalje koriste derivati hematoporfirina jer se temelje na ponovljivim i pouzdanim kemijskim procesima koji uobičajeno daju visok doprinos uz financijsku isplativost. Zbog toga derivati hematoporfirina komercijalno nude ponovljivu i pouzdanu terapiju. Fotosenzibilizatori se mogu podijeliti i prema lokalizaciji u ciljnoj stanici pa se tako na primjer ftalocijanini akumuliraju u mitohondrijima, derivati benzoporfirina u Golgijevom aparatu, aminolevulinska kiselina ulazi u staničnu membranu, lizosome i mitohondrije. Regije akumulacije u stanici mogu se znatno promijeniti ako se fotosenzibilizatori vežu na nosače kao što su nanočestice. Osim toga fotosenzibilizatori se mogu razlikovati po svojoj kemijskoj strukturi. Većina fotosenzibilizatora su ciklički tetrapiroli koji su derivati porfirina, klorina i bakterioklorina. Ove skupine spojeva pokazale su se kao plodno tlo za razvoj fotosenzibilizatora kroz procese pročišćavanja, adicije, supstitucije, suptrakcije primarnih ili bočnih lanaca. Takve modifikacije mogu dovesti po poboljšanja aktivnosti, ali mogu i rezultirati visoko toksičnim tvarima zbog čega mali broj modificiranih fotosenzibilizatora uspije doći do kliničke uporabe [17].

Spojevi korišteni u ovome radu su derivati porfirina. Porfirini su sveprisutni i igraju vitalne uloge u prirodnim sustavima te se nazivaju „pigmentima života“. Život se oslanja na biološke procese koji su katalizirani proteinima koji sadrže porfirine pa tako protoporfirin IX i njegov željezni kompleks čine hem grupu, magnezijev kompleks feofitina a i bakteriofeofitina a čine spojeve koji su poznati pod nazivima klorofil a i bakterioklorofil a [18], [19]. Porfirini su molekule koje se strukturalno opisuje kao tetrapiroalne makrocikle koji u sebi sadrže delokalizirane elektrone, imaju 18 π elektrona što ispunjava Hückelovo pravilo za aromatičnost (spoj sadrži $4n+2$ π

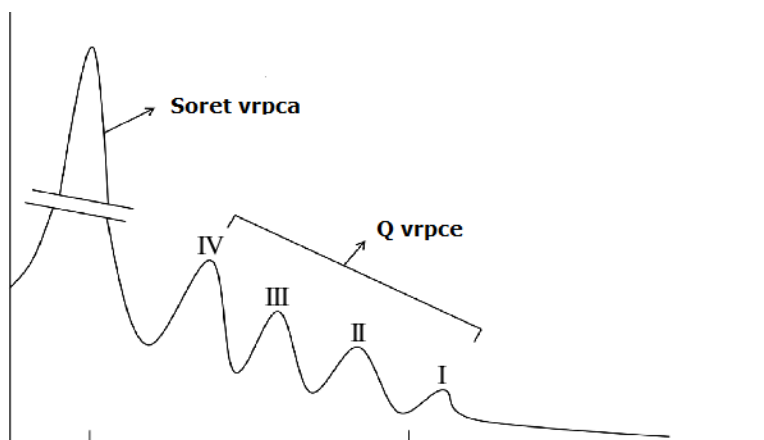
elektrona, n – cijeli broj) pa se kategorizira kao aromatični, ciklički, planarni i kontinuirano konjugirani sustav [19], [20]. Na slici 2. prikazan je porfin – osnovni dio kemijske strukture porfirina (četiri pirolne podjedinice vezane metinskim mostovima) i redosljed C atoma prema IUPAC-u. Ugljikovi atomi označeni brojevima 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 i 18 smatraju se β -pozicijom dok ugljikovi atomi označeni brojevima 5, 10, 15 i 20 se smatraju *meso*-pozicijom.



Slika 2. Kemijska struktura porfina, prilagođeno prema [19]

Jedna od najzanimljivijih obilježja porfirina je njihov specifičan UV/VIS spektar koji se sastoji od dvije zasebne regije: u bliskoj ultraljubičastoj regiji i u vidljivoj regiji. Prva regija odgovara prijelazu iz osnovnog singletnog stanja S_0 u pobuđeno singletno stanje S_2 i naziva se Soret-ova ili B vrpca te se javlja pri valnim duljinama 380-500 nm ovisno o tome je li porfirin *meso*- ili β -supstituiran. Prijelazi iz osnovnog singletnog stanja S_0 u pobuđeno singletno stanje S_1 vidljivi su kao četiri apsorpcijske vrpce pri valnim duljinama 500-750 nm te se nazivaju Q vrpce. Relativni intenzitet Q vrpce ovisi o poziciji i vrsti supstituenata prema čemu se porfirini mogu klasificirati kao *phyllo*, *oxo-rhodo*, *rhodo* i *etioporfirini*. Kada je relativni intenzitet Q vrpce $IV > III > II > I$ radi se o *etioporfirinima* (Slika 3.) što se vidi kod porfirina koji na šest ili više β -pozicijama imaju supstituente koji nemaju n elektrone – alkilne grupe (Slika 3.). Supstituenti s n elektrona kao što su vinilna ili karbonilna skupina na β -pozicijama mijenjaju relativni intenzitet Q vrpce u $III > IV > II > I$ što je

karakteristika *rhodoporfirina*. Ako se grupe nalaze na suprotnim pirolnim prstenovima intenzitet se mijenja u III>II>IV>I što odgovara *oxo-rhodoporfirinima*. Kada su okupirane *meso*-pozicija intenzitet se mijenja u IV>II>III>I što odgovara *phylloporfirinima*.



Slika 3. Tipičan apsorpcijski spektar *etioporfirina*. Preuzeto i prilagođeno iz [21].

1.2.1. Izvori svjetlosti

Pored dostupnosti kisika i fotosenzibilizatora, izvor svjetlosti je komponenta koja mora biti prisutna kako bi fotodinamička inaktivacija bila uspješna. Izvori svjetlosti mogu se podijeliti na laserske i nelaserske (lampe i diode koje emitiraju svjetlost (LED, skraćeno od eng. *Light Emitting Diode*)) izvore svjetlosti. Često korišteni laserski sustavi u fotodinamičkoj inaktivaciji su argonski laseri, laseri metalnih para, laseri diode i dr. Laseri su česti izbor kod fotodinamičke inaktivacije jer generiraju monokromatsku, koherentnu svjetlost te nude visoku optičku moć i valnu duljinu koja se može kontrolirati kako bi odgovarala određenom fotosenzibilizatoru. Laseri se mogu uklapati u optička vlakna kako bi se koristili za endoskopske ili intersticijske tretmane, a ako je potrebno tretirati veću površinu mogu se modificirati dodatkom leća za proširenje snopa svjetlosti [22]. Laserski sustavi su često tehnički komplicirani i preveliki, sposobni su emitirati jednu valnu duljinu, potrebno im je konstantno održavanje i zbog toga nisu financijski najisplativiji izbor kod odabira izvora svjetlosti za fotodinamičku inaktivaciju [22], [23]. Lampe su

prvi korišteni izvori svjetlosti koji su korišteni u fotodinamičkoj inaktivaciji osim sunčeve svjetlosti. Zbog osvjetljavanja većih površina i nemogućnosti fokusiranja svjetlosti na manje područje bez značajnog gubitka jakosti, lampe su pogodnije za tretiranje površinskih tumora pa se često koriste u dermatologiji i stomatologiji. Za fotodinamičku inaktivaciju koristi se više vrsta lampi kao što su: fluorescentne lampe, lampe sa žarnom niti, ksenonske, metal halidne i natrijeve lampe. Lampe emitiraju širok spektar svjetlosti (300 nm-1200 nm) zbog čega se moraju koristiti odgovarajući filteri kako bi se fotoaktivacijska valna duljina poklapala s apsorpcijskim vrpčama fotosenzibilizatora. Dozimetrijski izračuni su kompliciraniji nego kod lasera zbog širokog spektra svjetlosti koju emitiraju. Za razliku od lasera, lampe su jednostavnog dizajna, manje su i prilagodljive te su financijski isplativiji izvor svjetlosti [22]. LED lampe imaju širok izbor valnih duljina koje mogu emitirati (350nm-1100 nm), financijski su isplative i prijenosne, mogu se posložiti tako da osvjetljavaju velike površine, mogu se napajati na baterije te se mogu posložiti u razne geometrijske oblike [24].

1.3. Antimikrobna fotodinamička terapija

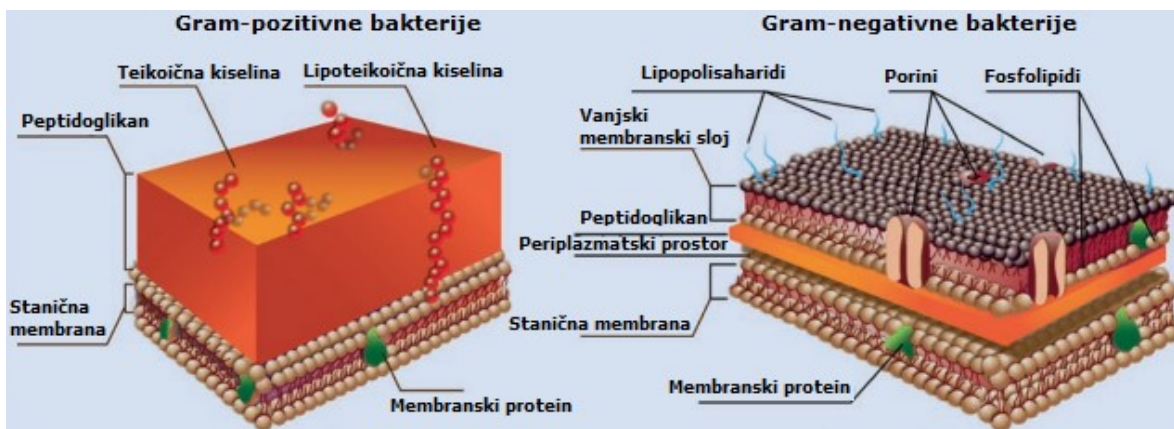
Fotodinamička inaktivacija već ima kliničke primjene za liječenje onkoloških i neonkoloških bolesti. Photofrin® je odobren ili čeka odobrenje za liječenje raka mokraćnog mjehura, opstruktivnog raka jednjaka, raka pluća, raka jednjaka i pluća u ranoj fazi, raka glave i vrata, raka kože, kao pomoćna terapija kod raka mozga, raka cerviksa i dr. Od neonkoloških bolesti fotodinamičkom inaktivacijom liječe se aktinička keratoza (fotosenzibilizator Levulan® (aminolevulinska kiselina)), makularna degeneracija povezana sa starenje, upalne akne vulgaris, a istražuje se mogućnost primjene za liječenje psorijaze i virusnih bradavica [7], [8].

Jedna od potencijalnih primjena fotodinamičke inaktivacije mogla bi biti dezinfekcija vode. Najčešće korištena metoda dezinfekcije voda uključuje korištenje tvari na bazi klora te je učinkovita protiv širokog spektra mikroba,

financijski je isplativa, lagana za provođenje, ali manje učinkovita protiv parazita i kao posljedica provedene dezinfekcije nastaju toksični nusprodukti. Postoje druge alternative za uporabu klora kao što su dezinfekcija UV zračenjem, ozonom, kloraminima, klor dioksidom i dr. Glavni nedostaci ovih metoda uključuju financijsku neisplativost, neučinkovitost, razvoj rezistencije, lakoću primjene, stabilnost te mutacije izazvane UV zračenjem. Primjena fotodinamičke inaktivacije za dezinfekcije voda imala bi prednosti kao što su: nemogućnost stvaranja rezistencije, mogućnost imobilizacije fotosenzibilizatora na netopljive nosače što bi uklonilo fotosenzibilizatore iz vode nakon tretmana i omogućilo ponovnu uporabu vode, dezinfekcija vode bez toksičnih nusprodukata, korištenje sunčeve svjetlosti za fotoaktivaciju fotosenzibilizatora, financijska isplativost, minimalan utjecaj na okoliš i dr. Sunčeva svjetlost penetrira duboko u vodu te bi se moglo postići jednoliko osvjetljenje velikih volumena vode, a porfirini bi mogli biti korišteni kao učinkoviti fotosenzibilizatori zbog Soret-ovih apsorpcijskih vrpca koje se nalaze pri 420-430 nm zbog čega bi došlo do poželjne interakcije s plavom svjetlosti koja duboko penetrira u vodu [9].

Kod primjene fotodinamičke inaktivacije protiv bakterija treba uzeti u obzir razlike u građi bakterija i prema tome odabrati odgovarajuće fotosenzibilizatore. Prema razlici u građi (Slika 4.) bakterije se mogu diferencirati bojanjem po Gramu. Gram-negativne bakterije (ružičasto obojenje) u svojoj građi imaju tanak sloj peptidoglikana koji se nalazi ispod vanjske membrane na kojoj se nalazi lipopolisaharid (LPS) koji doprinosi većoj rezistenciji u usporedbi s Gram-pozitivnim bakterijama. U odnosu na Gram-negativne bakterije, kod Gram-pozitivnih bakterija (ljubičasto obojenje) karakteristična je deblja stanična stijenka koju uglavnom čini peptidoglikan na koji mogu biti kovalentno vezane negativno nabijene molekule teikoične kiseline [25], [26]. Budući da je stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterija poroznija, protiv njih se mogu koristiti neutralni, kationski i anionski

fotosenzibilizatori. Kod Gram-negativnih bakterija, zbog tankog sloja peptidoglikana, funkciju regulacije prolaska molekula kroz bakterijsku stanicu regulira negativno nabijeni lipopolisaharid zbog čega je poželjno korištenje kationskih fotosenzibilizatora jer se u slučaju korištenja neutralnih ili anionskih fotosenzibilizatora bakterijske stanice moraju prvo tretirati membranskim disruptorima kako bi fotosenzibilizatori ušli u stanice [27], [28].



Slika 4. Razlika u građi stanične stijenke Gram-pozitivnih (lijevo) i Gram-negativnih (desno) bakterija. Preuzeto i prilagođeno iz [29].

1.4. *Legionella pneumophila*

U porodicu *Legionellaceae* spada rod *Legionella*. Preko 60 vrsta i više od 70 seroskupina je do sada otkriveno u porodici *Legionellaceae*, a najznačajnija je *Legionella pneumophila* koja čini skoro 90% svih humanih infekcija legionelama iza čega po učestalosti slijede *L. micdadei* (6%) i *L. bozemanii* (3%), a ostale vrste izazivaju manje od 1% legioneloza kod ljudi. Legionele se po obliku mogu opisati kao tanki pleomorfni štapići, a ovisno o uvjetima u kojima se nalaze mogu se javljati u filamentoznom obliku (dulje od 20 μm) i kokobacilarnom obliku (0,3-0,9 μm široke, oko 2 μm duge). Bakterije roda *Legionella* su pokretne te se kreću pomoću jedne do dvije polarnih i/ili lateralnih flagela, imaju pile, aerobne su bakterije, ne stvaraju pore, te su Gram-negativne. Podloge na kojima se uzgajaju bakterije roda *Legionella* moraju ispunjavati posebne nutritivne zahtjeve kao što je prisutnost L-

cisteina, kvašćevog ekstrakta, aktivnog ugljena i željeznih soli. *L. pneumophila* se u umjetnim hranilištima javlja u filamentoznom, a u kliničkim izolatima u kokobacilarnom obliku te ima monopolarnu flagelu i multiple pile. Prema specifičnoj antigenskoj građi, *L. pneumophila* je kategorizirana u 15 seroskupina od kojih *L. pneumophila* seroskupina 1 najčešće izaziva infekcije kod ljudi. U prirodi su legionele široko rasprostranjene te obitavaju u vodenom okruženju i u vlažnoj zemlji. Njihovom rastu pogoduje prisutnost komenzalne flore i organskog sedimenta, a sposobnost razmnožavanja u protozoima olakšava opstanak u nepovoljnim uvjetima. *Legionella spp.* preživljavaju temperature 0-63 °C, sustave tople vode koloniziraju i pri temperaturama 40-50 °C, a optimalna temperatura za rast je 36-37 °C [1].

Izravnim udisanjem ili mikroaspiracijom aerosola koji sadrži virulentne i nevirulentne sojeve dolazi do infekcije ljudi [2]. Infektivna doza i imunosni sustav domaćina diktiraju pojavu kliničkih simptoma. Iako se bolest prenosi udisanjem kontaminiranog aerosola, ne prenosi se s čovjeka na čovjeka [1]. Sposobnost razmnožavanja bakterija unutar stanica u makrofagima važna je za patogenezu. Nakon udisanja aerosola, virulentni sojevi *Legionella spp.* ulaze u alveolarne fagocite gdje se mogu nesmetano razmnožavati te inhibiraju spajanje fagosoma s lizosomima i acidifikaciju fagosoma što onemogućuje proteolitičku razgradnju bakterija [1], [2]. Bakterijski rast unutar inficiranih makrofaga se procjenjuje na oko 100-1000 puta u roku od 48-72 h. Nakon razmnožavanja unutar makrofaga, bakterije uništavaju makrofage apoptozom i/ili nekrozom stvarajući pore, nakon čega se ispuštaju u izvanstanični okoliš gdje mogu inficirati druge makrofage. *L. pneumophila Philadelphia-1* se fagocitira posebnim mehanizmom koji se naziva namatajuća fagocitoza (eng. *coiling phagocytosis*) (Slika 5.). Inicijacija mehanizma počinje vezanjem C3b komponente komplementa za purinski protein na vanjskoj membrani bakterije, nakon toga dolazi do vezanja na C1 ili C3 receptor na površini

fagocita. Na ovaj način patogen asimetrično zahvaća unilateralni pseudopod koji se namata oko bakterije i tako je unosi u stanicu fagocita [2].



Slika 5. Shematski prikaz namatajuće fagocitoze (eng. coiling phagocytosis). Preuzeto i prilagođeno iz [30].

Bakterijski proteini koji omogućavaju unos i preživljavanje legionela u fagocitima su: glavni protein vanjske membrane (MOMP skraćeno od eng. *Major Outer Membrane Proteine*) koji je nužan za interakcije s C1 i C3 receptorima na monocitima, protein vanjske membrane bakterijske stanice (MIP skraćeno od eng. *Macrophage Infectivity Potentiator*) koji omogućuje preživljavanje legionela unutar stanica. *L. pneumophila* izlučuje lipazu, fosfolipazu, proteolitičke enzime, deoksiribonukleazu, ribonukleazu, a pokazuje i enzimatsku aktivnost katalaze, oksidaze i β -laktamaze. Radi β -laktamaze za liječenje legioneloza se ne koriste penicilini i cefalosporini [1]. Legioneloze se pojavljuju u dva različita klinička oblika pontijačka groznica i legionarska bolest. Mnogi ljudi koji su seropozitivni na legionele ne pokazuju nikakve simptome [31]. Pontijačka groznica se prezentira kao febrilna bolest koja nalikuje gripi i koja je samolimitirajuća [1]. Legionarsku bolest nije moguće klinički razlikovati od drugih vrsta pneumonije zbog čega treba provesti odgovarajuće mikrobiološke testove na pojedincima za koje se smatra da su visokorizičnoj skupini [31]. Neki od simptoma legionarske bolesti su: glavobolja, bolovi u mišićima, slabost, visoka temperatura, suhi kašalj, rjeđe sukrvavi i produktivni kašalj, pleuralna bol, osip, bol u abdomenu, probavne i bubrežne smetnje, oštećenja funkcija jetre i središnjeg živčanog

sustava, razdražljivost, zbunjenost, ukočenost, halucinacije i dr. [1], [2]. Laboratorijski nalazi oboljelih često pokazuju povećanu sedimentaciju eritrocita, promjene u broju leukocita, visoke vrijednosti C-reaktivnog proteina, hematurija, proteinurija, hiponatrijemija, i povećane vrijednosti aminotransferaza [1]. U rijetkim slučajevima *Legionella spp.* mogu se proširiti na druge organe putem krvi ili limfnog sustava te izazvati nerespiratorne simptome kao što su: sinusitis, celulitis, infekcija rana, artritis, perikarditis, miokarditis, endokarditis, ruptura slezene, splenomegalija, pankreatitis, upale središnjeg živčanog sustava i dr. [2]. Obolijevaju većinom osobe srednje ili starije životne dobi, ali se bolest može javiti u svim dobnim skupinama. Imunokompromitirani bolesnici, bolesnici s kroničkim bolestima kao što su kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest i kronična opstruktivna bolest pluća češće obolijevaju, a alkoholizam i pušenje su česti čimbenici rizika. Transplantacija bubrega i hemodijaliza povećava rizik od obolijevanja i letalnog ishoda bolesti. Bolest završava smrću u 5-20 % slučajeva zbog imunokompromitiranosti zaražene osobe, neadekvatnog izbora antibiotika i komplikacija [1].

Budući da se kasniji početak terapije za liječenje legionarske bolesti povezuje s većim stopama mortaliteta, potrebno je kod osoba hospitaliziranih zbog upale pluća stečene u zajednici uključiti antibiotike koji se koriste za liječenje legionarske bolesti. Ovakve promjene u načinu liječenja bolesnika koji boluju od upale pluća stečene u zajednici dovele su do smanjena smrtnosti od legionarske bolesti u SAD-u u 1990.-im godinama [31]. Istraživanja su pokazala da su antibiotici koji postižu terapijske unutarstanične koncentracije u alveolarnim makrofagima uspješniji u liječenju legionarske bolesti od antibiotika koji imaju slabu unutarstaničnu penetraciju te su se zbog toga klinički učinkovitim pokazali: makrolidi, kinoloni, tetraciklini, tigeciklin, doksiciklin, rifampin i trimetoprim-sulfametoksazol. Makrolid eritromicin se koristio za liječenje legionarske bolesti, ali se danas rjeđe koristi zbog

neželjenih nuspojava te ga zamjenjuju noviji makrolidi (klaritromicin i azitromicin) i antibiotici iz drugih skupina kao što su fluorokinoloni (levofloksacin, gatifloksacin, moksifloksacin) i novi glicilciklinski lijekovi [2].

Prevenција i kontrola infekcija bakterijama *Legionella spp.* uključuje utvrđivanje mogućih izvora kontaminiranog aerosola i smanjenje proizvodnje aerosola u prostorima gdje postoji rizik od kontaminacije bakterijama *Legionella spp.* Za suzbijanje legioneloza potrebno je redovno uzimati uzorke i kulturirati ih iz izvora pitke vode, rutinski održavati sustave za hlađenje i grijanje vode tako da se temperatura hladne vode održava ispod 20 °C, a tople vode iznad 46 °C, kontrolirati rast bakterija u pitkoj vodi koristeći termalnu dezinfekciju, dezinfekciju UV zračenjem, hiperkloriranjem, ozonom, osigurati ispravnu sanitarno-tehničku izvedbu klimatizacije, grijanja i vodoopskrbe te spriječiti miješanje tehničkih i sanitarno-opskrbnih voda [1], [2]. Budući da su bakterije u biofilmu otpornije na biocidna sredstva i termalne tretmane vode nego slobodno-cirkulirajuće bakterije, smanjenje legionela u biofilmu je važan aspekt kontrole proliferacije bakterija i može poboljšati učinkovitost kontrole bakterijskog rasta u vodi i samim time pomoći u prevenciji legioneloza [2].

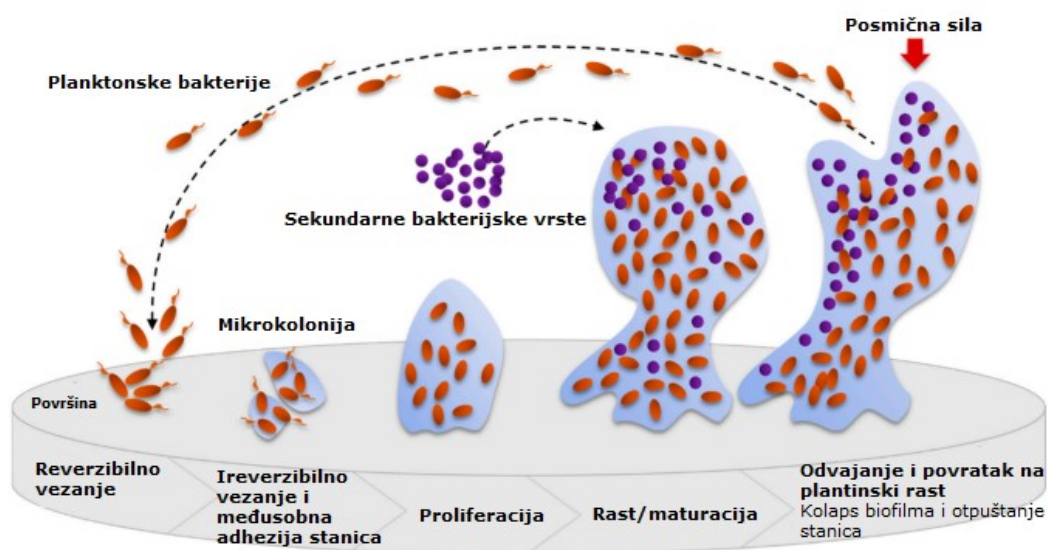
1.5. Bakterijski biofilm

Biofilm se definira kao sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno vezane jedne za druge i za supstrat, uronjene su u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koje su same izlučile te se fenotipski razlikuju od planktonskih mikroorganizama zbog promjena u brzini reprodukcije i transkripcije gena [1]. Bakterije stvaraju biofilm iz više razloga, a jedan od njih je zaštita. Bakterije u biofilmu mogu se oduprijeti promjenama u okolišu koje bi stavile veliki stres na slobodno-cirkulirajuće bakterije. U biofilmu su bakterije zaštićene od osmotskih promjena, sila koje stvara strujanje tekućine, promjena pH vrijednosti te utjecaja antibiotika i antimikrobnih peptida. Osim zaštite, bakterijama u biofilmu je olakšana međusobna komunikacija procesom koji se naziva detekcija kvoruma, a odnosi se na

detekciju malih signalnih molekula (autoinduktorske molekule) koje bakterije luče. Detekcijom kvoruma bakterije procjenjuju gustoću i stanje biofilma, a proces se odvija u tri koraka: bakterije luče male signalne molekule koje difundiraju do gusto pakiranih stanica u okolini, stanice koje su primatelji signala se reprogramiraju i mijenjaju ekspresiju gena i na kraju dolazi do promjene u ponašanju koja je izazvana promjenama u ekspresiji gena. Osim kemijskih signala bakterije u biofilmu komuniciraju mehaničkim i električnim signalima. Pored zaštite i komunikacije biofilm drži bakterije blizu jedne drugih što olakšava komunikaciju, nutrijenti se mogu koncentrirati i držati na razini koja promovira njihov dotok u biofilm, izvanstanični matriks i adhezini imaju veću vjerojatnost kontakta sa susjednim stanicama ako su blizu jedne drugih. Blizina bakterija u biofilmu omogućuje i horizontalni transfer gena pa je poznato da konjugacija i transdukcija potpomažu oblikovanje strukture biofilma, a moguće je i razmjenjivanje genetičkih informacija koje su povezane s virulentnosti i rezistencijom na antibiotike pa tako biofilm može biti inkubator za razvoj rezistentnih ili virulentnih sojeva bakterija [29].

Formacija biofilma započinje adhezijom bakterijskih stanica te lučenjem egzo-polimernih tvari koje čine ljepljivi ugljikohidrati, adhezini i nukleinske kiseline. Ugljikohidrati se lijepe za tkiva domaćina ili površine gdje će se stvoriti biofilm pa čak i bakterijske stanice. Jedna bakterija ili grupa bakterija u procesu adhezije se veže za te površine pomoću pila, flagela i receptora i nakon što se nekoliko bakterija vezalo, počinju se dijeliti i formirati mikrokoloniju koja će rasti trodimenzionalno u visinu i u širinu od početnog mjesta adhezije [29], [32]. Ta faza formiranja dijeljenja bakterija i rasta mikrokolonije naziva se proliferativna faza. Rastuća mikrokolonija poprima oblik gljive ili tornada, luči se više egzo-polimernih tvari i formacija biofilma ulazi u treću fazu koja se naziva maturacija biofilma. U toj fazi struktura može narasti i do tisuću mikrona u dijametru, izgledom podsjeća na gljivu kojoj je baza usidrena na površini materijala na koji je adherirala u početku [29]. U

takvom okolišu bakterije često uspore svoj metabolizam, a bakterijske stanice čine samo 15-20% biofilma dok ostatak čini izvanstanični matriks [1], [29]. S površine zrelog biofilma bakterije se mogu odvojiti i ponovno adherirati na drugom mjestu u domaćinu ili na materijalu na kojemu je stvoren inicijalni biofilm. Disperzija biofilma može biti potaknuta lučenjem proteina koji degradiraju izvanstanični matriks, infekcijom bakteriofagom ili mehaničkim stresom [29]. Faze formacije biofilma prikazane su shematski na Slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz stvaranja biofilma. Prevedeno i prilagođeno iz [32].

1.6. *Legionella pneumophila* biofilm

Bakterija *L. pneumophila* u prirodi se može naći u planktonskom obliku, ali može i formirati biofilme. Kolonizacija i opstanak *L. pneumophila* u prirodi posredovano je stvaranjem biofilma, preživljavanjem u slatkovodnim amebama i *Caenorhabditis elegans* [33]. Kultivirana u laboratoriju, *L. pneumophila* može stvoriti biofilme koji su građeni od samo jedne vrste, a u prirodi može tvoriti biofilme s više vrsta mikroorganizama. Jedni od najvažnijih mikroorganizama koji diktiraju preživljenje *L. pneumophila* su protozoe jer ih bakterije koriste kako bi se unutar njihovih stanica replicirale. Ko-evolucija s više vrsta protozoa dovela je do razvijanja mehanizama koji

omogućuju bakteriji *L. pneumophila* da okupira velik broj različitih domaćina i inficira ljudske stanice. Rast legionela u biofilmovima mogao bi povećavati njihovu virulenciju, a bakterije *L. pneumophila* koje potječu iz biofilmova izbjegavaju odgovor prirođenog imunološkog sustava u makrofagima [3].

Zanimljivo je da su u prirodi legionele zastupljene u manjini u biofilmovima u odnosu na druge vrste pa je moguće da na prisutnost *L. pneumophila* u biofilmovima utječu drugi mikroorganizmi. Prema tome neke bakterijske vrste imaju pozitivan (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Empedobacter breve*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella pneumoniae*), a neke negativan (*Sphingomonas sp.*, *Acidovorax sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*) utjecaj na kolonizaciju i opstanak *L. pneumophila* u biofilmovima. Iako *P. aeruginosa* ima inhibitoran učinak na kolonizaciju biofilma legionelama taj učinak se može umanjiti prisutnosti bakterije vrste koja pozitivno utječe na kolonizaciju biofilma kao što je *K. pneumoniae*. Prema tome pozitivan utjecaj *K. pneumoniae* na preživljenje *L. pneumophila* može u isto vrijeme smanjiti inhibitorni efekt *P. aeruginosa* iz čega se može zaključiti da identitet, broj i priroda interakcija među bakterijskim vrstama može imati izravan učinak na rast *L. pneumophila* u biofilmu [33]. Prisutnost ameba određuje je li prisutnost *P. aeruginosa* inhibitorna za kolonizaciju biofilmova bakterijama *L. pneumophila* pa se tako u biofilmovima koji sadrže *Actanthamoeba castellanii* i *P. aeruginosa* povećava unos *L. pneumophila* u *A. castellanii* i kolonizacija biofilmova. *L. pneumophila* luči surfaktant koji luči protein TolC koji je toksičan za druge *Legionella* vrste, a nema utjecaj na *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* i *K. pneumoniae* zbog čega se može pretpostaviti da bi *L. pneumophila* mogla utjecati na rast drugih *Legionella* vrsta i njihovom prirodnom staništu. Biomasa protozoa u biofilmovima izravno je vezana s količinom *L. pneumophila* u biofilmovima te prisutnost protozoa u izvorima voda za ljude predstavlja rizik od kontaminacije *L. pneumophila*. Osim što se bakterije *L. pneumophila* mogu razmnožavati

unutar stanica protozoa, bakterije su zaštićene od okolišnih stresora uključujući biocidna sredstva pa tako *L. pneumophila* koja tvori biofilm u prisutnosti termotolerantnih ameba opstaje i nakon termičkih obrada vode [3].

Na prvi korak stvaranja biofilma tj. adheziju stanica na biotičke ili abiotičke površine i kolonizaciju utječu mnogi okolišni faktori. Vrsta materijala na koju bakterije adheriraju ima važnu ulogu pa tako bakar inhibira vezanje bakterija dok se bakterije uspješno mogu vezati za različite vrste plastika koje se koriste u umjetno stvorenim sustavima voda. Kationi imaju utjecaj na vezanje bakterija na različite supstrate i mogu doprinijeti obraštanju [3]. Nasuprot učinku bakra, prisutnost mangana promovira kolonizaciju legionelama, a drugi metalni ioni kao što su cink i željezo su potrebni za rast bakterija, posebno *L. pneumophila* koji ovisi o željezu jer ima Fe superoksidnu dismutazu i cink-metaloproteazu koji su važni patogeni čimbenici [34]. Koncentracije željeza moraju bit strogo kontrolirane jer željezo u suvišku može biti toksično zbog proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, a prisutnost visokih koncentracija željeza i željeznih soli ometa i inhibira formiranje biofilma *L. pneumophila* [33]. Ioni kalcija i magnezija promoviraju prijanjanje *L. pneumophila* za abiotičke površine, povećane količine cinka, mangana i magnezija povezane su povećanom kontaminacijom bakterijama *L. pneumophila*, a cink potpomaže vezanje bakterija za stanice domaćina što upućuje na to da bi ioni mogli regulirati i vezanje na biotičke površine. Prisutnost ugljika pri temperaturama od 20 °C povećala je formiranje biofilma pa bi pozitivan utjecaj ugljika mogao biti prisutan samo pri određenim temperaturama [3]. Pri 25 °C *L. pneumophila* stvara biofilm koji oblikom podsjeća na gljivu i sadrži vodene kanale, a čine ga bakterije štapićastog oblika, dok biofilm stvoren pri temperaturi od 37-42 °C ne sadrži vodene kanale i deblji je te ga čine bakterije filamentoznog oblika [3], [33]. Još jedan od važnih okolišnih čimbenika koji mogu utjecati na stvaranje biofilma je

stagnacija vode koja je uz temperaturu od 25-50 °C kritičan čimbenik za rast legionela. Procjenom kvalitete vode u talijanskim bolnicama nakon tri mjeseca *lockdown*-a zbog COVID-19 u vodi je pronađena veća koncentracija *L. pneumophila* zbog nekorištenja bolnice. Jedna od metoda prevencije dugoročne stagnacije vode je ispiranje umjetno stvorenih sustava vode povećanjem protoka vode na određeni vremenski period što je smanjilo količine *L. pneumophila* u tim sustavima. Ova strategija kombinira se s termičkom i kemijskom obradom vode te je posebno važna kod dodavanja biocidnih tvari u vodu kako bi se osigurale jednake razine biocidnih sredstava u cijelom sustavu [35]. Međutim, biofilmovi mogu opstati u umjetno stvorenim sustavima vode i pod turbulentnim protokom vode i održati populaciju *L. pneumophila* tako da se bakterije nakupljaju u sedimentu gdje je manji utjecaj protoka vode.

2. CILJ RADA

Cilj istraživanja u ovom radu je odrediti minimalne efektivne koncentracije i ispitati anti-adhezivna i anti-biofilm svojstva u vodama različitih tvrdoća (demineralizirana, meka i tvrda voda) koristeći otopine kationskih fotosenzibilizatora različitih koncentracija (dva hidrofilna i jedan amfifilni fotosenzibilizator) na bakteriji *L. pneumophila*. Osim toga cilj je utvrditi postoje li statistički značajne razlike u učinkovitosti spojeva s obzirom na tvrdoću vode.

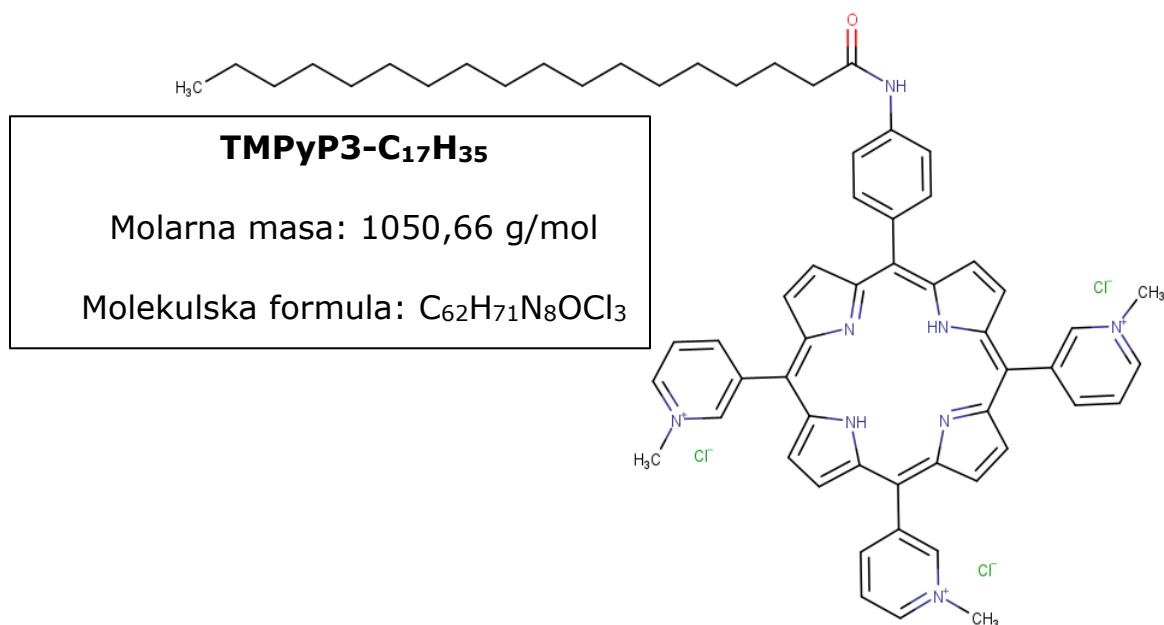
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Korišteni pribor i uređaji

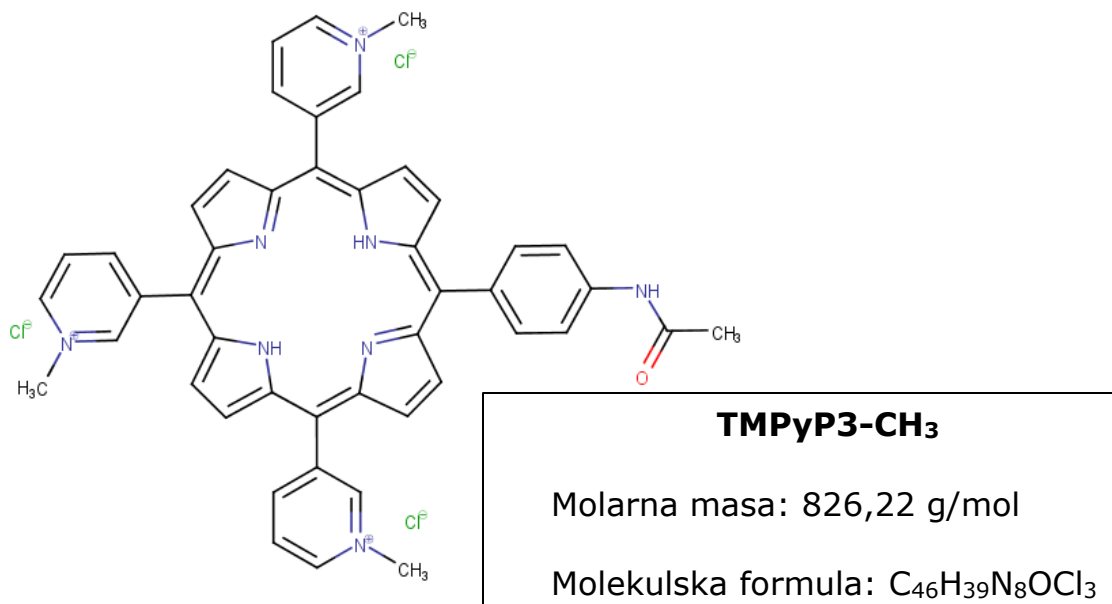
- staklene epruvete s čepom (15 mL)
- stalak za epruvete
- plastične mikrobiološke ušice
- šprice
- sterilni mikrofilter za šprice
- sterilna, filtrirana voda različite tvrdoće
- autoklavirana voda iz slavine
- BCYE (eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) agar
- plastične Petrijeve pločice
- LED lampa – Laboratorij za fotoniku i kvantnu optiku, Zavod za eksperimentalnu fiziku, Institut Ruđer Bošković (394 nm, 40 mW/cm²)
- inkubator tresilica (Heidolph UNIMAX 1010, Njemačka)
- plastične kivete za spektrofotometar
- spektrofotometar (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka)
- mikrotitarske pločice s okruglim i ravnim dnom (96 well, ROLL, Piove di Sacco, Italija)
- ultrazvučna kupelj (Bandelin-BactoSonic, Njemačka)
- parafilm i aluminijska folija
- inkubator (Termo-medicinski aparati, Bodalec & Havočić, Dugo Selo – Zagreb, Hrvatska)
- miješalica Kartell TK35, Italija
- nastavci za pipete 2-200 µL, 100-1000 µL (Gilson, SAD)
- multikanalna pipeta 0,5-300 µL (Transferpette S-8, Njemačka)
- automatske mikropipete 2-20 µL, 20-100 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL (Gilson, SAD)
- plamenik (POLIGAS OMH)

3.2. Korišteni spojevi

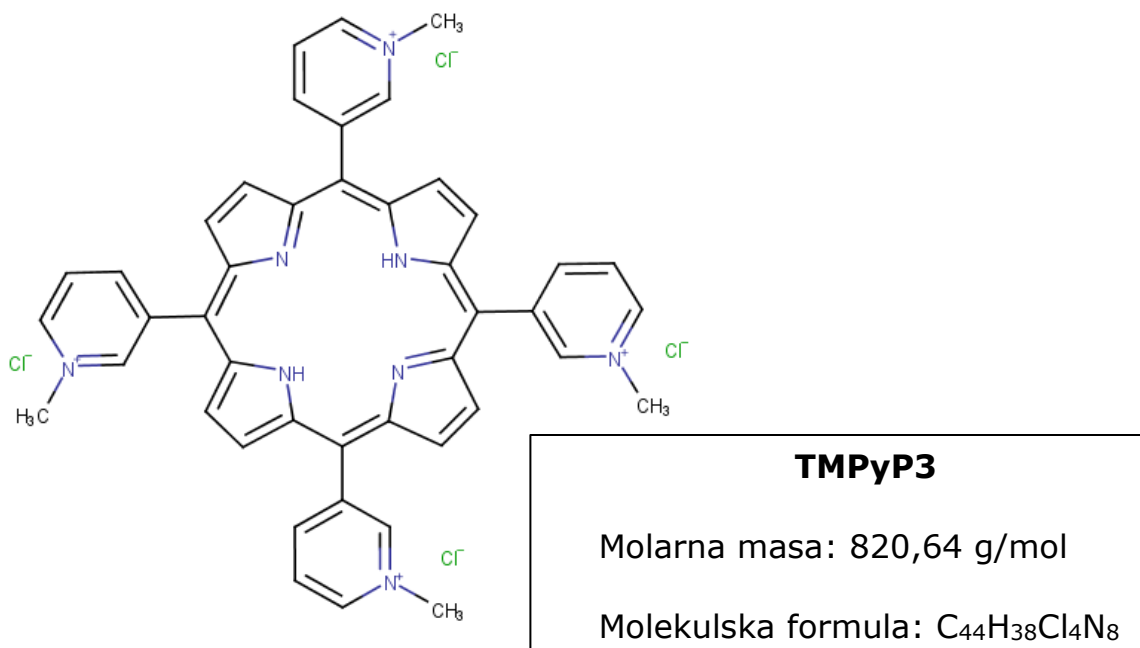
Za provođenje eksperimenata opisanih u ovome radu, korištena su tri porfirinska fotosenzibilizatora koje je sintetizirala Martina Mušković, mag.med.chem., pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nele Malatesti u Laboratoriju za organsku kemiju i kemiju čvrstog stanja na Odjelu za biotehnologiju u Rijeci. Sinteza i karakterizacija spojeva navedena je u radovima [5], [36], [37]. Korišteni su kationski porfirini od kojih je jedan amfifilni spoj 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tri(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin klorid (**TMPyP3-C₁₇H₃₅**) (Slika 7.), a dva su hidrofilna spoja, 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin klorid (**TMPyP3-CH₃**) (Slika 8.) i 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin tetraklorid (**TMPyP3**) (Slika 9.). Za sva tri spoja pripravljene su *stock* otopine u demineraliziranoj sterilnoj vodi koncentracije 200 μM. Nakon toga otopine su sterilizirane filtracijom kroz mikrofilter i pohranjene u zatamnjenu staklenu ambalažu omotanu aluminijskom folijom kako bi se što više smanjila izloženost spojeva svjetlosti. *Stock* otopine su čuvane u hladnjaku na +4 °C.



Slika 7. Kemijska struktura kationskog amfifilnog porfirina 5-(4-oktadekanamidofenil)-10,15,20-tri(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin klorid (**TMPyP3-C₁₇H₃₅**)



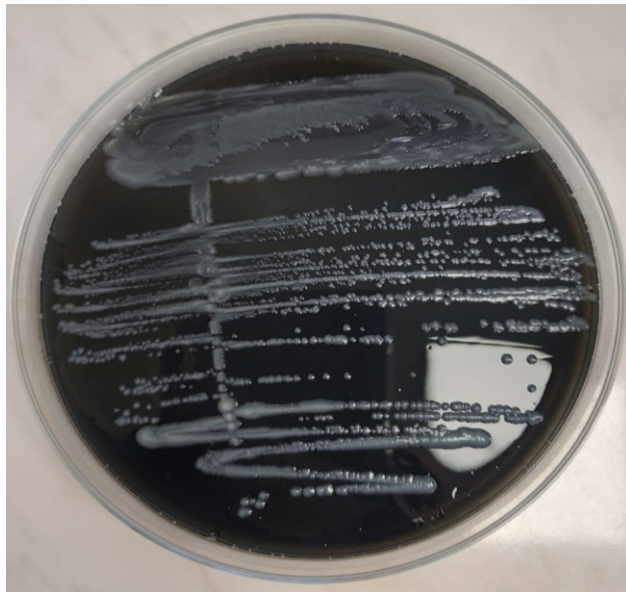
Slika 8. Kemijska struktura kationskog hidrofilnog porfirina 5-(4-acetamidofenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin klorid (**TMPyP3-CH₃**)



Slika 9. Kemijska struktura kationskog hidrofilnog porfirina 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metilpiridin-3-il)porfirin tetraklorid (**TMPyP3**)

3.3. Bakterijski soj

Svi eksperimenti opisani u radu provedeni su na kliničkom izolatu Gram-negativne bakterije *Legionella pneumophila*, seroskupina 1, soj *Philadelphia* ST1. Klinički izolat *L. pneumophila* dobiven je ljubaznošću prof. Darje Keše sa Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija. Prije pohranjivanja u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, bakterije su suspendirane u 10%-tnom glicerol bujonu i alikvotirane. Kako bi se bakterije mogle koristiti u eksperimentima za pripremu *stock* i radne bakterijske suspenzije, moraju prije toga biti nasađene na BCYE agar (eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*) i inkubirane pri $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 3-5 dana (Slika 10.)



Slika 10. *Legionella pneumophila*, seroskupina 1, soj *Philadelphia* ST1 nakon nasađivanja na BCYE agar i inkubacije na $35\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 3-5 dana

3.4. BCYE agar (eng. *Buffered Charcoal Yeast Extract*)

Za pripremu podloge selektivne za legionele (BCYE agar) potrebno je: 900 mL sterilne destilirane vode, 20 g agara, 10 g kvašćevog ekstrakta, 10 g ACES pufera (*N*-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid), 2 g aktivnog ugljena i 1 g α -ketoglutarata. Nakon što je pH smjese namješten na $6,9\pm 0,2$ koristeći 10 M KOH, smjesa je autoklavirana na $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 15 min. U

autoklaviranu smjesu dodano je 10 mL L-cisteina (hidrokloridni monohidrat i 10 mL Fe(NO₃)₂). Nakon što se smjesa ohladi na temperaturu od 50 °C, potrebno ju je izliti u sterilne Petrijeve zdjelice tako da debljina podloge bude oko 4 mm. Tako pripremljene podloge pohranjene su u hladnjaku pri +4 °C.

3.5. Uzorci voda različitih tvrdoća

Korištena su tri uzorka voda različitih tvrdoća: demineralizirana voda kojoj je vrijednost tvrdoće vode 0, meka voda (Zdenac Nedelišće) kojoj izmjerena vrijednost tvrdoće vode iznosi 231 mg/L CaCO₃ ili 12.94 °D te tvrda voda (Zdenac Prelog) za koju je izmjerena tvrdoća vode 403 mg/L CaCO₃ ili 22.57 °D. Analiza tvrdoće voda provedena je u laboratoriju Međimurske Vode, Čakovec, Hrvatska. Kako bi se vode mogle koristiti za provedbu eksperimenata, sterilizirane su filtracijom kroz mikrofilter i do uporabe pohranjene u hladnjaku na +4 °C.

Sterilna vodovodna voda iz slavine koristila se za ispiranja i pripremu serijskih deseterostrukih razrjeđenja za potrebe određivanja broja kultivabilnih bakterija. Voda je sterilizirana autoklaviranjem pri standardnim uvjetima. Autoklaviranje vode uklonilo je nepoželjne mikroorganizme, ali i inaktiviralo klor zaostao u vodi nakon uobičajenog tretmana vodovodne vode za piće. Nakon autoklaviranja voda je pohranjena u hladnjaku na +4 °C.

3.6. Bakterijski inokulum

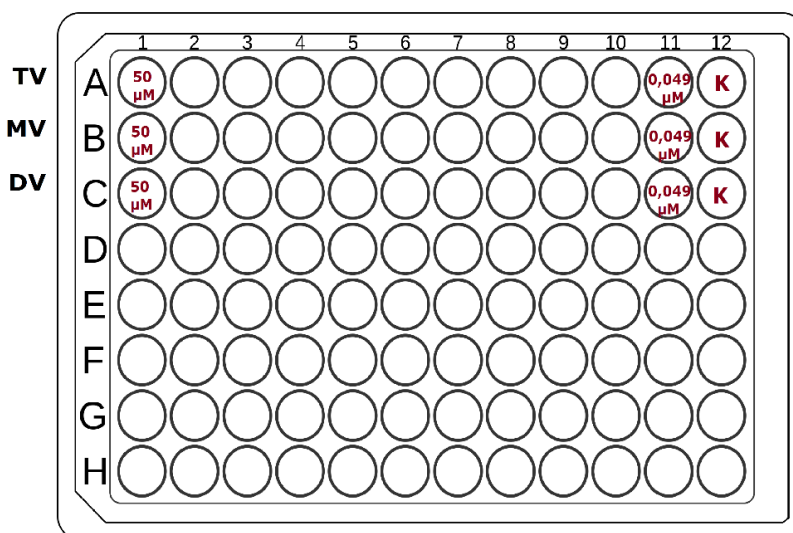
U sterilnu staklenu eprvetu dodano je oko 3 mL demineralizirane vode. Sterilnom mikrobiološkom ušicom pokupljene su kolonije *L. pneumophila* porasle na BCYE agaru (Slika 10.) i resuspendirane u demineraliziranoj vodi. Bakterijska suspenzija je homogenizirana na miješalici (Kartell TK35, Italija). Mjereći optičku gustoću pri 600 nm (OD₆₀₀) (eng. *Optical Density*) na spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka) pripremljena je *stock* bakterijska suspenzija koncentracije 1x10⁹ CFU/mL (vrijednosti OD₆₀₀ = 1, odgovara koncentracija bakterija 1x10⁹ CFU/mL u suspenziji). Za slijepu

probu korištena je demineralizirana voda. Pripremom serijskih deseterostrukih razrjeđenja pripremljene su radne bakterijske suspenzije u tri vode različite tvrdoće koncentracije 1×10^6 CFU/mL.

3.7. Određivanje minimalne efektivne koncentracije (MEK) fotosenzibilizatora mikrodilucijskom metodom u uzorcima voda različitih tvrdoća

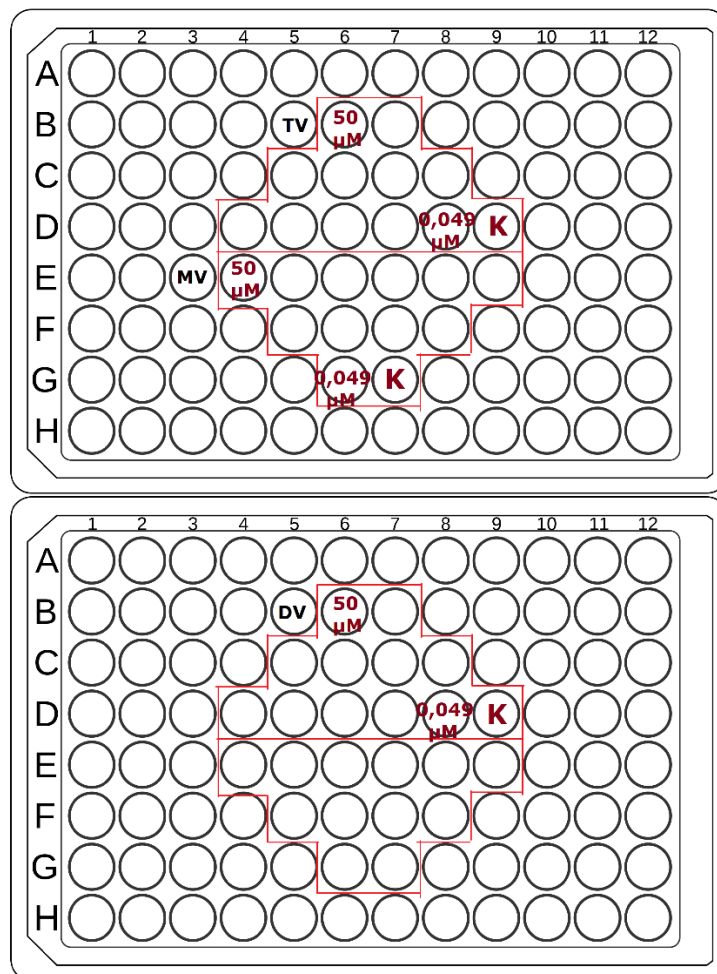
Minimalna efektivna koncentracija (MEK) fotosenzibilizatora određena je mikrodilucijskom metodom u tri vode različite tvrdoće; u tvrdoj vodi, mekoj vodi i demineraliziranoj vodi. Mikrodilucijska metoda korištena za određivanje minimalne efektivne koncentracije opisana je u radu [37].

U sterilnoj mikrotitarskoj pločici (ROLL, Piove di Sacco, Italija) pripremljena su dvostruka serijska razrjeđenja ($100 \mu\text{L}$) sva tri fotosenzibilizatora (TMPyP3- $\text{C}_{17}\text{H}_{35}$, TMPyP3- CH_3 , TMPyP3) u tri uzorka voda različite tvrdoće u koncentracijskom rasponu $50 \mu\text{M}$ - $0,049 \mu\text{M}$.



Slika 11. Preuzeta s [38] i prilagođena. Shematski prikaz mikrotitarske pločice na kojoj je određivana MEK vrijednost fotosenzibilizatora gdje uzorci nisu izlagani izvoru svjetlosti.

TV – tvrda voda, MV – meka voda, DV – demineralizirana voda, K - kontrola



Slika 12. Preuzeto s [38] i prilagođeno. Shematski prikaz mikrotitarskih pločica na kojima su određivane MEK vrijednosti fotosenzibilizatora gdje su uzorci izlagani izvoru svjetlosti. TV – tvrda voda, MV – meka voda, DV- demineralizirana voda, K – kontrola

Za ispitivanje MEK vrijednosti u mraku razrjeđenja za svaku kombinaciju vode i spoja rađena su u jednom redu pločice (Slika 11.). Budući da izvor svjetlosti ravnomjerno osvjetljava specifična područja pločice, serijska razrjeđenja za ispitivanje MEK vrijednosti na svjetlu rađena su u tom prostoru na pločici koje izvor svjetlosti ravnomjerno osvjetljava (Slika 12.). Zadnji stupci (mrak)/jažice (svjetlo) poslužili su kao kontrola za ovaj eksperiment i u njima se nalazio odgovarajući uzorak sterilne vode različite tvrdoće. Nakon što su pripremljena serijska razrjeđenja fotosenzibilizatora, u sve jažice, osim kontrolnih jažica, dodano je 100 μL bakterijske suspenzije (10⁶ CFU/mL), koja

je kao i razrjeđenja fotosenzibilizatora bila pripremljena u sva tri uzorka voda različite tvrdoće. Pripremljeni uzorci inkubirani su u mraku (pločice su zamotane aluminijskom folijom), pri sobnoj temperaturi u tresilici (Heidolph UNIMAX 1010, Njemačka) u vremenskom periodu od 30 minuta (Slika 13.).

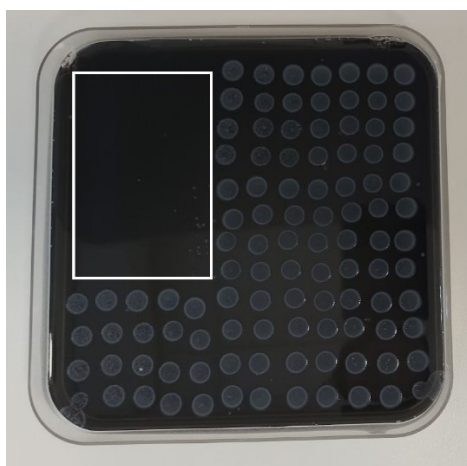


Slika 13. Prikaz tresilice (Heidolph UNIMAX 1010, Njemačka) u kojoj su pripremljeni uzorci inkubirani u mraku, pri sobnoj temperaturi, kroz 30 minuta

Nakon inkubacije ispitivani uzorci izloženi su izvoru svjetlosti (LED lampa (eng. *Light Emitting Diode*) valna duljina $\lambda=395$ nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) na 10 minuta (Slika 14.). Nakon osvjetljavanja, pločica je zamotana u aluminijsku foliju kako bi se što više minimiziralo izlaganje svjetlosti i uzorci su inkubirani u inkubatoru na 24 h, u mraku pri temperaturi 35 ± 2 °C. Nakon inkubacije, 10 μ L svakog uzorka nanoseno je na BCYE agar u duplikatu. Nakon inkubacije pri 35 ± 2 °C, kroz 3-5 dana, odredila se vrijednost minimalne efektivne koncentracije, a ta vrijednost predstavlja najmanju koncentraciju spojeva pri kojoj nije uočen rast bakterija (Slika 15.). Za određivanje minimalne efektivne koncentracije fotosenzibilizatora u mraku praćena je ista procedura s tim da je izostavljeno izlaganje izvoru svjetlosti.



Slika 14. Prikaz LED lampe ($\lambda=395$ nm i intenzitet 20 mW/cm²) koja je korištena kao izvor svjetlosti za provođenje eksperimenata u ovom radu.

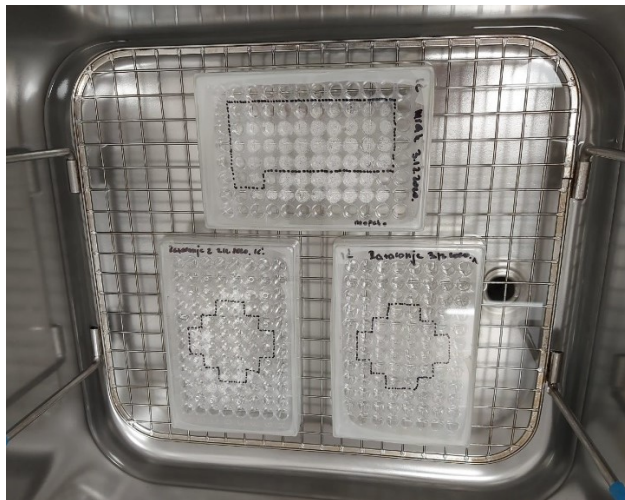


Slika 15. Reprezentativni prikaz dobivenih rezultata prema kojima je MEK vrijednost određena kao najmanja koncentracija fotosenzibilizatora pri kojoj nije uočen porast bakterija na BCYE podlozi

3.8. Ispitivanje anti-adhezijskih svojstava fotosenzibilizatora u uzorcima voda različitih tvrdoća

U tri različita uzorka voda različitih tvrdoća pripravljene su bakterijske suspenzije (10^6 CFU/mL) i otopine fotosenzibilizatora te su u mikrotitarske pločice dodani po 100 μ L bakterijskih suspenzija i 100 μ L otopina fotosenzibilizatora. Svaka kombinacija fotosenzibilizatora i vode ispitivana je

u triplikatu. Konačna koncentracija fotosenzibilizatora nakon što su pomiješani s bakterijskim suspenzijama iznosila je $0,5 \times \text{MEK}$ ($1,563 \mu\text{M}$ za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te $3,125 \mu\text{M}$ za TMPyP3) i $0,25 \times \text{MEK}$ ($0,782 \mu\text{M}$ za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te $1,563 \mu\text{M}$ za TMPyP3). Korištene su vrijednosti minimalne efektivne koncentracije određene za meku vodu. Mikrotitarske pločice zamotane su u aluminijsku foliju i uzorci su inkubirani u mraku u tresilici, na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta. Nakon inkubacije uzorci su izloženi izvoru ljubičaste svjetlosti u vremenskom periodu od 10 minuta (LED lampa, $\lambda=395 \text{ nm}$, intenzitet 20 mW/cm^2 , ukupna doza svjetlosti 12 J/cm^2) i stavljeni na inkubaciju u mraku na 24 h pri temperaturi $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 16. Prikaz mikrotitarskih pločica u ultrazvučnoj kupelji za vrijeme sonificiranja (frekvencija 40 kHz, snaga 200 W)

Slijedeći inkubaciju, tretirani uzorci u mikrotitarskim pločicama su isprani dva puta sterilnom vodovodnom vodom kako bi se otklonile bakterije koje nisu adherirale na površinu jažica. Nakon toga, rubovi mikrotitarskih pločica zamotani su parafilmom kako bi se spriječio ulazak vode te su pločice stavljene u ultrazvučnu kupelj (Bandelin-BactoSonic, Njemačka) (Slika 16.). Uzorci su u ultrazvučnoj kupelji sonificirani pri frekvenciji 40 kHz i snazi 200 W u vremenskom periodu od 1 minute. Ovaj postupak je izvršen kako bi se bakterije adherirane na površinu jažica odlijepile. Koristeći pipetu uzorci su

resuspendirani, sastrugane su stijenke jažica te su preneseni u mikrotitarsku pločicu gdje su u sterilnoj vodovodnoj vodi priređena deseterostruka serijska razrjeđenja. Automatskom pipetom nanoseno je 10 μ L svakog od priređenih razrjeđenja na BCYE agar u duplikatu. Pločice su inkubirane u inkubatoru pri 35 ± 2 °C. Nakon 3-5 dana inkubacije izbrojane su kolonije koje su porasle na hranjivim podlogama (Slika 17.). Za ispitivanje anti-adhezijskih svojstava fotosenzibilizatora u mraku postupalo se po opisanoj proceduri s tim da je izostavljeno izlaganje uzoraka izvoru svjetlosti.



Slika 17. Prikaz kolonija koje su izrasle na BCYE agaru nakon tretiranja ispitivanim spojevima (TMPyP3-C₁₇H₃₅, TMPyP3-CH₃, and TMPyP3) i 10-minutnog izlaganja izvoru svjetlosti (LED lampa, $\lambda=395$ nm i intenzitet 20 mW/cm²)

3.9. Ispitivanje anti-biofilm svojstava fotosenzibilizatora u uzorcima voda različitih tvrdoća

Ispitivanje anti-biofilm svojstava fotosenzibilizatora provedeno je na sličan način kao i prethodno opisano istraživanje anti-adhezijskih svojstava. Korištene su iste koncentracije fotosenzibilizatora, odnosno vrijednosti $0,5 \times \text{MEK}$ i $0,25 \times \text{MEK}$ određene za meku vodu mikrodilucijskom metodom. Nakon što su pomiješane bakterijske suspenzije (10^6 CFU/mL) i otopine spojeva pripremljene u sva tri uzorka voda različite tvrdoće, pripremljeni uzorci inkubirani u tresilici, u mraku kroz 30 minuta, nakon čega su izloženi

izvoru ljubičaste svjetlosti na 10 minuta (LED lampa, $\lambda=395$ nm i intenzitet 20 mW/cm^2 , ukupna doza svjetlosti 12 J/cm^2). Mikrotitarske pločice su zamotane u aluminijsku foliju i uzorci su inkubirani u inkubatoru pri 35 ± 2 °C kroz 5 dana. Nakon 5-dnevne inkubacije, uzorci su isprani dva puta sterilnom vodovodnom vodom i sonificirani u ultrazvučnoj kupelji (1 min, snaga 200 W, frekvencija 40 kHz). Nakon sonificiranja, uzorci su resuspendirani, površine jažica su sastrugane i u novoj mikrotitarskoj pločici su pripremljena deseterostruka serijska razrjeđenja koja su nasadena na BCYE agar. Nakon 3-5 dana inkubacije u inkubatoru pri 35 ± 2 °C izbrojane su kolonije porasle na agaru. Kod ispitivanja anti-biofilm svojstava fotosenzibilizatora u mraku praćena je ista procedura s tim da je izostavljeno izlaganje uzoraka izvoru svjetlosti.

3.10. Statistička obrada podataka

Podaci koji su dobiveni eksperimentalno su statistički obrađeni u programu GraphPad Prism 8. Kod izrade grafičkih prikaza upotrebljavane su vrijednosti izražene kao srednje vrijednosti statistički obrađenih podataka ponavljanih mjerenja, a pripadajuće standardne devijacije su na grafičkim prikazima prikazane kao trake pogrešaka. U programu GraphPad Prism 8 provedena je analiza rezultata pri čemu se koristila dvosmjerna ANOVA analiza varijanci. Razlike su se smatrale statistički značajnim ako su ispunjavale uvjet $\alpha < 0,05$. S obzirom na razinu statističke značajnosti korištene su oznake: **** ($p < 0,0001$), *** ($0,0001 < p < 0,001$), ** ($0,001 < p < 0,01$) i * ($0,01 < p < 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Minimalna efektivna koncentracija (MEK) u vodama različitih tvrdoća

Određena je minimalna efektivna koncentracija (MEK) za amifilni trikationski spoj TMPyP3-C₁₇H₃₅, hidrofilni trikationski spoj TMPyP3-CH₃ i hidrofilni tetrakationski spoj TMPyP3 u uzorcima voda različitih tvrdoća (tvrda voda - 403 mg/L CaCO₃, meka voda - 231 mg/L CaCO₃ i demineralizirana voda - 0). Tablica 1. prikazuje MEK vrijednosti dobivene nakon izlaganja spojeva i bakterijskih suspenzija izvoru ljubičaste svjetlosti (LED lampa, $\lambda=395$ nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) i bez izlaganja izvoru svjetlosti.

Tablica 1. Minimalna efektivna koncentracija (MEK) spojeva TMPyP3, TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ određena u tri različita uzorka voda (tvrda voda, meka voda, demineralizirana voda) bez izlaganja izvoru svjetlosti (u tablici - MRAK) i nakon 10-minutnog tretmana ljubičastim svjetlom pod LED lampom, $\lambda=395$ nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm² (u tablici - $\lambda = 395$ nm).

	TMPyP3		TMPyP3-CH ₃		TMPyP3-C ₁₇ H ₃₅	
	$\lambda = 395$ nm	MRAK	$\lambda = 395$ nm	MRAK	$\lambda = 395$ nm	MRAK
TVRDA VODA	12,500	>25	6,250	>25	6,250	>25
MEKA VODA	6,250	>25	3,125	>25	3,125	6,250
DEMINERALIZIRANA VODA	3,125	6,250	0,780	3,125	0,780	3,125

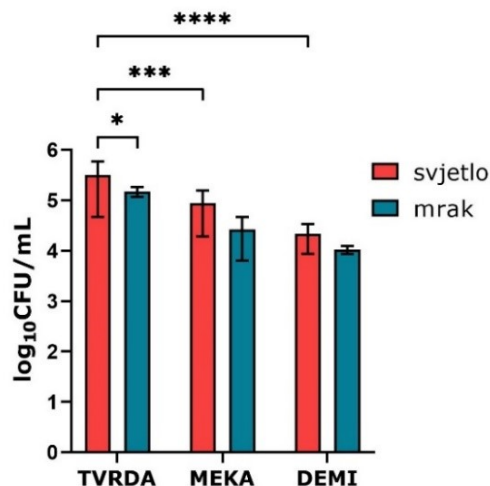
Iz MEK vrijednosti u mraku i na svjetlu prikazanih u tablici vidljivo je da se MEK vrijednosti u oba slučaja (svjetlo i mrak) povećavaju s povećanjem koncentracije otopljenih iona u vodi tj. s povećanjem tvrdoće vode. Amifilni trikationski fotosenzibilizator TMPyP3-C₁₇H₃₅ i hidrofilni trikationski fotosenzibilizator TMPyP3-CH₃ imaju iste MEK vrijednosti u sva tri uzorka voda nakon 10-minutnog izlaganja izvoru svjetlosti; tvrda voda 6,25 μ M, meka

voda 3,125 μM i demineralizirana voda 0,78 μM . MEK vrijednosti tetrakationskog hidrofilnog fotosenzibilizatora TMPyP3 nakon 10-minutnog izlaganja izvoru svjetlosti su dva puta veće u tvrdoj vodi (12,5 μM) i mekoj vodi (6,25 μM) te četiri puta veća u demineraliziranoj vodi (3,125 μM) u odnosu na hidrofilne trikationske fotosenzibilizatore. Toksičnost u mraku zamijećena je kod svih spojeva u demineraliziranoj vodi, za trikationske porfirine TMPyP3- $\text{C}_{17}\text{H}_{35}$ i TMPyP3- CH_3 iznosi 3,125 μM , a za tetrakationski porfirin TMPyP3 dva puta je veća tj. 6,25 μM . Kod amfifilnog trikationskog porfirina TMPyP3- $\text{C}_{17}\text{H}_{35}$ uočena je toksičnost u mraku u mekoj vodi gdje je određena MEK vrijednost koja iznosi 6,25 μM dok je za hidrofilne spojeve ta vrijednost $>25 \mu\text{M}$.

4.2. Anti-adhezijska svojstva fotosenzibilizatora (PS) u uzorcima voda različitih tvrdoća

Prije ispitivanja anti-adhezijskih svojstava fotosenzibilizatora ispitane su sposobnosti bakterija *L. pneumophila* za adheziju na polistiren u mraku i nakon 10-minutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti (LED lampa, $\lambda=395$ nm, intenzitet 20 mW/cm^2 , ukupna doza svjetlosti 12 J/cm^2) (Slika 18.). Eksperiment je proveden kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri izlaganje izvoru svjetlosti i tvrdoća vode utječu na sposobnost bakterija za adheziju na polistiren.

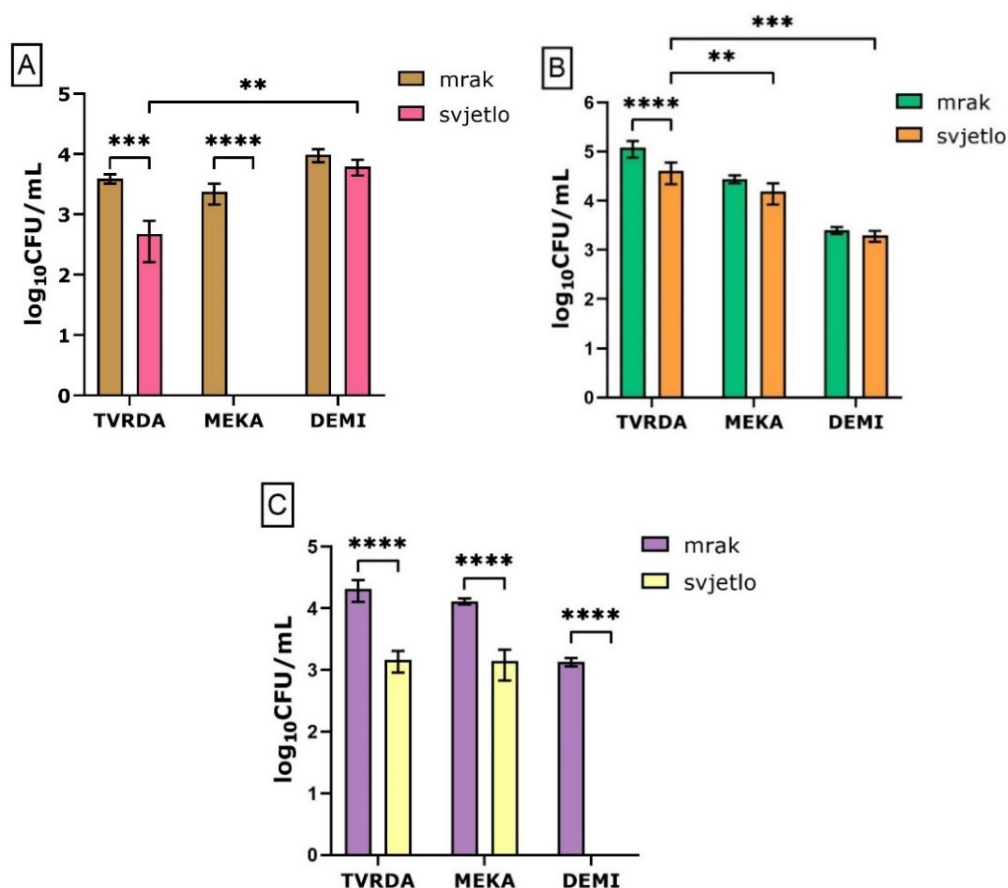
Pozitivan utjecaj izlaganja izvoru svjetlosti na sposobnost bakterija za adheziju na polistiren je gotovo zanemariv. Tvrdoća vode tj. povećana koncentracija iona otopljenih u vodi ima pozitivan utjecaj na sposobnost bakterija za adheziju na polistiren u uzorcima koji su tretirani svjetlom pa je tako zamijećeno statistički značajno povećanje sposobnosti bakterija za adheziju na polistiren u tvrdoj vodi u odnosu na meku i demineraliziranu vodu nakon izlaganja uzoraka svjetlosti (Slika 18. – svjetlo)



Slika 18. Grafički prikaz sposobnosti bakterija *L. pneumophila* za adheziju na polistiren u uzorcima voda različitih tvrdoća (TVRDA – tvrda voda, MEKA – meka voda, DEMI- demineralizirana voda) nakon 10-minutnog izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti (na slici – svjetlo) (LED lampa, $\lambda=395$ nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) i bez izlaganja izvoru svjetlosti (na slici- mrak). Na grafičkom prikazu rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanih mjerenja \pm SD; **** ($p < 0,0001$), *** ($0,0001 < p < 0,001$), * ($0,01 < p < 0,05$).

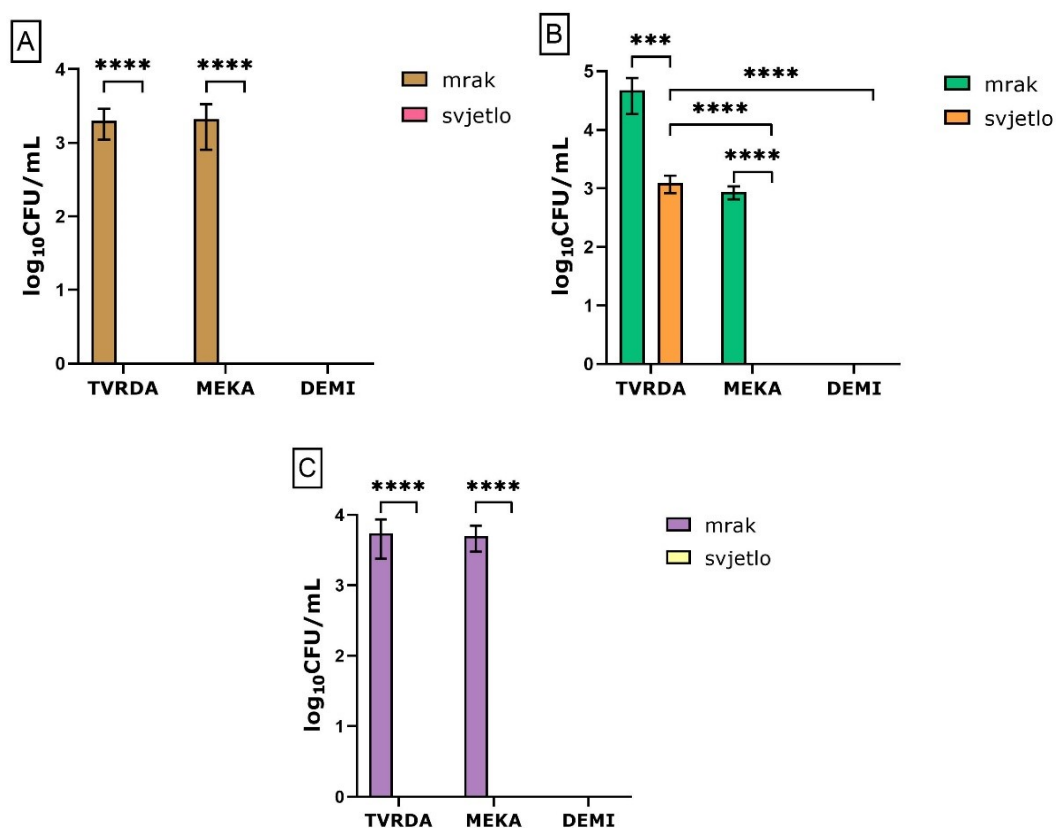
Nakon što je ispitana sposobnost bakterija za adheziju na polistiren, ispitana su anti-adhezijska svojstva spojeva TMPyP3, TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ u koncentracijama koje odgovaraju $0,25 \times$ MEK u mekoj vodi ($0,782$ μ M za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te $1,563$ μ M za TMPyP3) (Slika 19.). Kod spoja TMPyP3 uočena je 100%-tna inhibicija adhezije na polistiren u mekoj vodi (Slika 19A. - MEKA) nakon izlaganja izvoru svjetlosti. U tvrdoj vodi (Slika 19A. - TVRDA, svjetlo) došlo je do smanjenja broja poraslih kolonija, CFU (eng. *colony-forming unit*), za oko 50% u usporedbi s kontrolom (Slika 18. - TVRDA, svjetlo). U demineraliziranoj vodi (Slika 19A. - DEMI, svjetlo) nakon izlaganja uzoraka izvoru svjetlosti nije došlo do značajnog smanjenja CFU vrijednosti u usporedbi s kontrolom (Slika 18. - DEMI, svjetlo). Nakon tretmana spojem TMPyP3-CH₃ u demineraliziranoj vodi (Slika 19B. - DEMI, svjetlo) zamijećeno je smanjenje CFU vrijednosti za oko 30% u odnosu na kontrolu, dok u tvrdoj (Slika 19B. - TVRDA, svjetlo) i mekoj vodi (Slika 19B. - MEKA, svjetlo) nije

zamijećena statistički značajna razlika u CFU vrijednosti nakon tretmana i izlaganja izvoru svjetlosti. U demineraliziranoj vodi je uočena toksičnost u mraku kod spoja TMPyP3-CH₃ (Slika 19B. – DEMI, mrak) i spoja TMPyP3-C₁₇H₃₅ (Slika 19C. – DEMI, mrak) gdje je došlo do smanjenja CFU vrijednosti za oko 1 log₁₀ CFU/mL u odnosu na kontrolu (Slika 18. – DEMI, mrak).



Slika 19. Grafički prikaz anti-adhezijskih svojstava spojeva TMPyP3 (A), TMPyP3-CH₃ (B) i TMPyP3-C₁₇H₃₅ (C) u koncentraciji koja odgovara vrijednosti 0,25×MEK u mekoj vodi (0,782 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te 1,563 μM za TMPyP3) bez izlaganja izvoru svjetlosti (na slici - mrak) i nakon izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti (LED lampa, λ=395 nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) (na slici - svjetlo) u uzorcima voda različitih tvrdoća (TVRDA – tvrda voda, MEKA – meka voda, DEMI – demineralizirana voda). Na grafičkom prikazu rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanih mjerenja ±SD; **** (*p* < 0,0001), *** (0,0001 < *p* < 0,001), ** (0,001 < *p* < 0,01).

Do potpune inaktivacije adhezije došlo je kod spoja TMPyP3-C₁₇H₃₅ u demineraliziranoj vodi (Slika 19C. – DEMI, svjetlo), a u tvrdoj (Slika 19C. – TVRDA, svjetlo) i mekoj vodi (Slika 19C. – MEKA svjetlo) zamijećeno je smanjenje CFU vrijednosti u oba slučaja za oko 30% u odnosu na kontrole (Slika 18. TVRDA i MEKA, svjetlo).



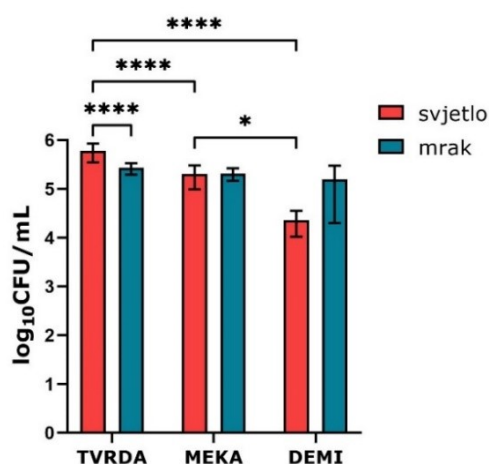
Slika 20. Grafički prikaz anti-adhezijskih svojstava spojeva TMPyP3 (A), TMPyP3-CH₃ (B) i TMPyP3-C₁₇H₃₅ (C) u koncentraciji koja odgovara vrijednosti 0,5×MEK u mekoj vodi (1,563 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te 3,125 μM za TMPyP3) bez izlaganja izvoru svjetlosti (na slici - mrak) i nakon izlaganja izvoru ljubičaste svjetlosti (LED lampa, λ=395 nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) (na slici - svjetlo) u uzorcima voda različitih tvrdoća (TVRDA – tvrda voda, MEKA – meka voda, DEMI – demineralizirana voda). Na grafičkom prikazu rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanih mjerenja ±SD; **** (*p* < 0,0001), *** (0,0001 < *p* < 0,001).

Povećanjem koncentracije fotosenzibilizatora na 0,5×MEK (1,563 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te 3,125 μM za TMPyP3) u demineraliziranoj vodi

za sva tri spoja (Slika 20A, B, C – DEMI, mrak) uočena je jaka toksičnost u mraku gdje je došlo do 100%-tne inaktivacije adhezije bez izlaganja izvoru svjetlosti. U tvrdoj i mekoj vodi kod spojeva TMPyP3 (Slika 20A. – TVRDA i MEKA, svjetlo) i TMPyP3-C₁₇H₃₅ (Slika 20C. – TVRDA i MEKA, svjetlo) uočena je 100%-tna inaktivacija adhezije nakon izlaganja izvoru svjetlosti. Potpuna inhibicija adhezije nakon osvjetljavanja uočena je u mekoj vodi kod spoja TMPyP3-CH₃ (Slika 20B. – MEKA, svjetlo), dok je u tvrdoj vodi (Slika 20B. – TVRDA, svjetlo) CFU vrijednost umanjena za oko 50% u odnosu na kontrolu.

4.3. Anti-biofilm svojstva fotosenzibilizatora (PS) u uzorcima voda različitih tvrdoća

Na slici 15. prikazana je sposobnost bakterija *L. pneumophila* za stvaranje 5-dnevnog biofilma na polistirenu te utjecaj koncentracije iona i tretmana svjetlom.

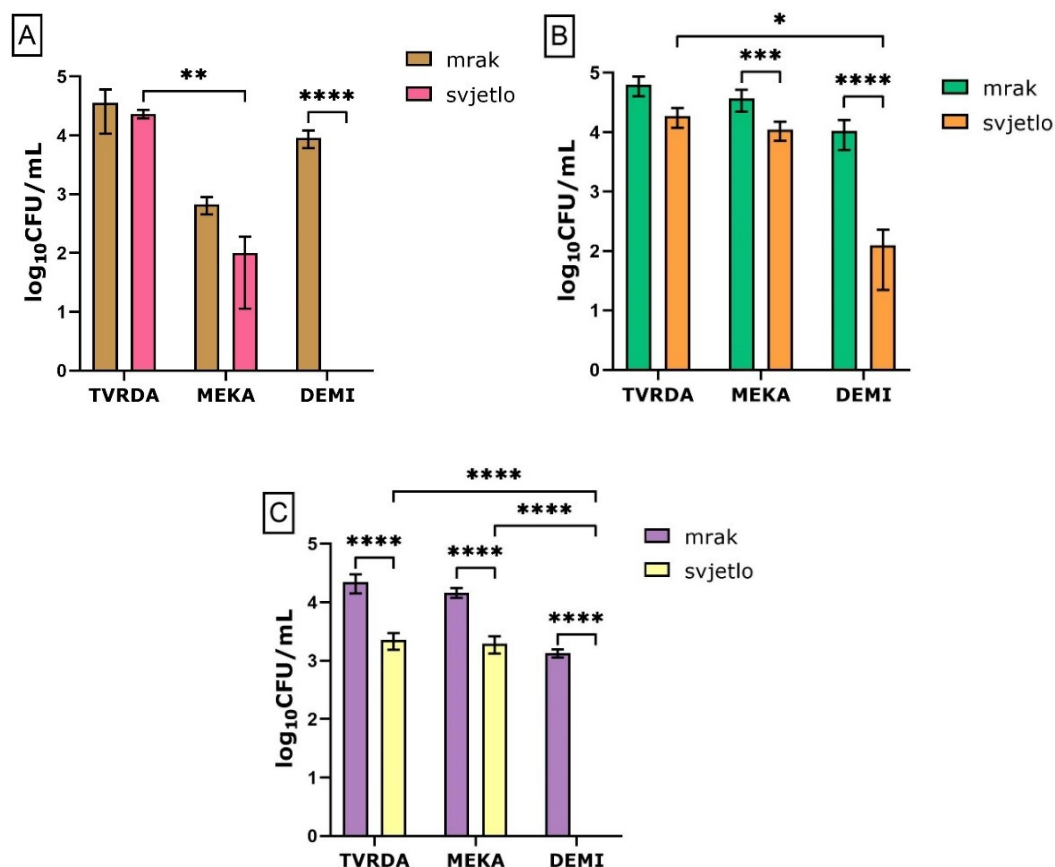


Slika 21. Grafički prikaz utjecaja svjetlosti i tvrdoće vode na formaciju 5-dnevnog biofilma bakterije *L. pneumophila* u uzorcima voda različitih tvrdoća (TVRDA – tvrda voda, MEKA – meka voda, DEMI- demineralizirana voda) nakon 10-minutnog izlaganja ljubičastom izvoru svjetlosti (na slici – svjetlo) (LED lampa, $\lambda=395$ nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) i bez izlaganja izvoru svjetlosti (na slici- mrak) nakon čega je uslijedila 5-dnevna inkubacija na 35±2 °C. Na grafičkom prikazu rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanih mjerenja ±SD; **** ($p < 0,0001$), * ($0,01 < p < 0,05$).

U demineraliziranoj vodi došlo je do smanjenja broja poraslih kolonija nakon 10-minutnog tretmana svjetlom, nakon čega su uzorci inkubirani na 5 dana pri 35 ± 2 °C kako bi se formirao biofilm, za 1 log u odnosu na uzorke koji nisu izlagani izvoru svjetlosti. U ostalim uzorcima nije opažena značajna razlika između uzoraka koji su pripremljeni u vodama u kojima su različite koncentracije iona (tvrda i meka voda) te nije opažena značajna razlika između uzoraka koji nisu osvijetljeni (Slika 21. - mrak) i onih koji su tretirani svjetlom (Slika 21. - svjetlo).

Nakon što su ispitani utjecaj svjetlosti i tvrdoće vode na sposobnost bakterija *L. pneumophila* za formiranje 5-dnevnog biofilma, ispitana su antibiofilm svojstva fotosenzibilizatora u koncentracijama koje odgovaraju $0,25 \times \text{MEK}$ u mekoj vodi ($0,782 \mu\text{M}$ za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te $1,563 \mu\text{M}$ za TMPyP3). Kod spoja TMPyP3 u demineraliziranoj vodi (Slika 22A. - DEMI, svjetlo) uočena je potpuna inhibicija stvaranja biofilma nakon osvjetljavanja uzoraka u odnosu na kontrolu (Slika 21. - DEMI, svjetlo). U mekoj vodi (Slika 22A. - MEKA svjetlo) došlo je do smanjenja CFU vrijednosti za oko 60% u odnosu na kontrolu (Slika 21. - MEKA, svjetlo), a u tvrdoj vodi (Slika 22A. - TVRDA, svjetlo) nije uočena značajna razlika u CFU vrijednosti nakon tretmana. U mekoj vodi uočena je toksičnost u mraku (Slika 22A. - MEKA, mrak) gdje je CFU vrijednost smanjena za više od 2 log u odnosu na kontrolu (Slika 21. - MEKA, mrak). Nakon tretmana spojem TMPyP3-CH₃ u demineraliziranoj vodi (Slika 22B. - DEMI, svjetlo) došlo je do smanjenja CFU vrijednosti za oko 3 log u odnosu na kontrolu (Slika 21. - DEMI, svjetlo), dok u tvrdoj i mekoj vodi (Slika 22B. - TVRDA i MEKA, svjetlo) nije došlo do značajne promjene nakon tretmana i izlaganja izvoru svjetlosti. Do potpune inaktivacije nakon tretmana i izlaganja izvoru svjetlosti došlo je kod spoja TMPyP3-C₁₇H₃₅ u demineraliziranoj vodi (Slika 22C. - DEMI, svjetlo), dok je u tvrdoj i mekoj vodi (Slika 22C. - TVRDA i MEKA, svjetlo) došlo do smanjenja

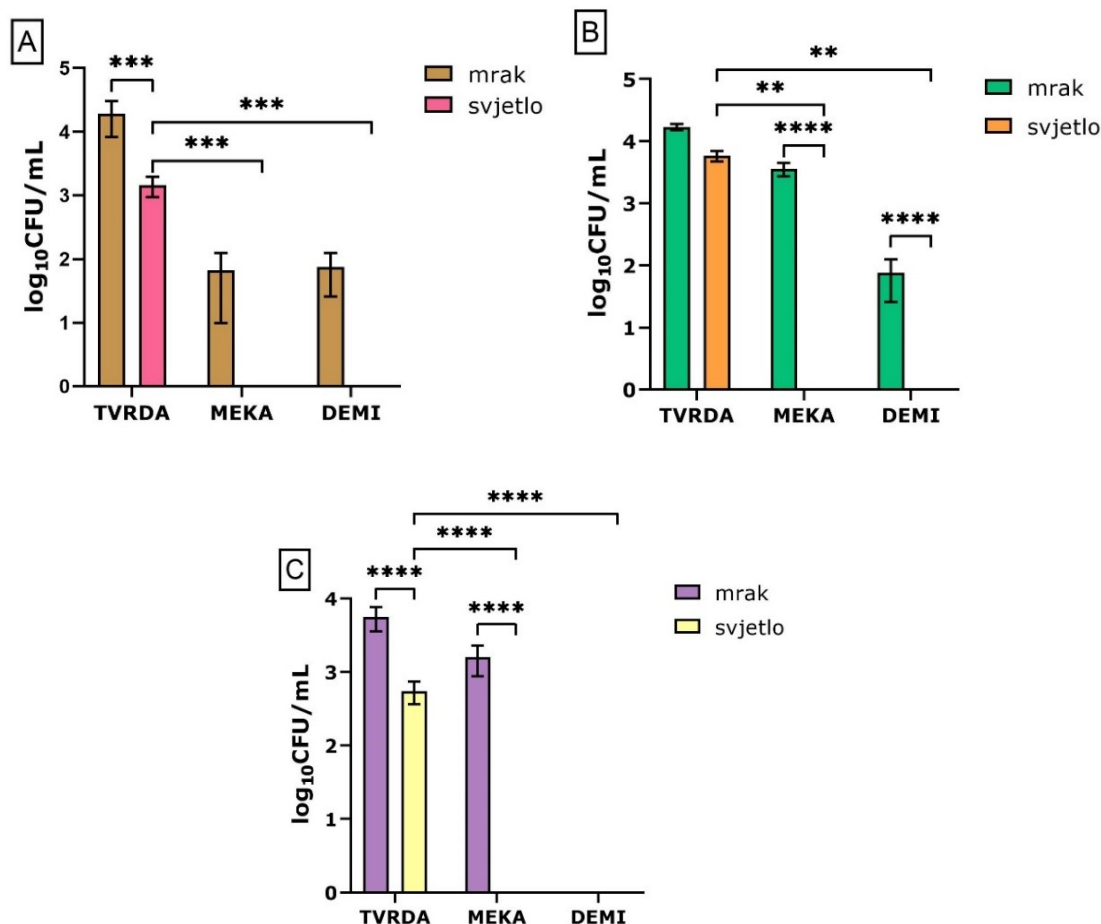
CFU vrijednosti za oko 40% u odnosu na kontrole (Slika 21. – TVRDA i MEKA, svjetlo).



Slika 22. Grafički prikaz anti-biofilm svojstava spojeva TMPyP3 (A), TMPyP3-CH₃ (B) i TMPyP3-C₁₇H₃₅ (C) u koncentraciji koja odgovara vrijednosti 0,25×MEK u mekoj vodi (0,782 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te 1,563 μM za TMPyP3) bez izlaganja izvoru svjetlosti (na slici - mrak) i nakon izlaganja ljubičastom izvoru svjetlosti (LED lampa, λ=395 nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) (na slici - svjetlo) u uzorcima voda različitih tvrdoća (TVRDA – tvrda voda, MEKA – meka voda, DEMI – demineralizirana voda). Na grafičkom prikazu rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanih mjerenja ±SD; **** ($p < 0,0001$), *** ($0,0001 < p < 0,001$), ** ($0,001 < p < 0,01$) i * ($0,01 < p < 0,05$).

Povećanjem koncentracije na 0,5×MEK (1,563 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te 3,125 μM za TMPyP3) uočena je toksičnost u mraku gdje je do potpune inaktivacije bez izlaganja izvoru svjetlosti došlo kod spoja TMPyP3-

C₁₇H₃₅ u demineraliziranoj vodi (Slika 23C. – DEMI, mrak). Kod spoja TMPyP3 u mekoj i demineraliziranoj vodi (Slika 23A. – MEKA i DEMI, mrak) došlo je do smanjenja CFU vrijednosti za više od 50% u odnosu na kontrole.



Slika 23. Grafički prikaz anti-biofilm svojstava spojeva TMPyP3 (A), TMPyP3-CH₃ (B) i TMPyP3-C₁₇H₃₅ (C) u koncentraciji koja odgovara vrijednosti 0,5×MEK u mekoj vodi (1,563 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ te 3,125 μM za TMPyP3) bez izlaganja izvoru svjetlosti (na slici - mrak) i nakon izlaganja ljubičastom izvoru svjetlosti (LED lampa, λ=395 nm, intenzitet 20 mW/cm², ukupna doza svjetlosti 12 J/cm²) (na slici - svjetlo) u uzorcima voda različitih tvrdoća (TVRDA – tvrda voda, MEKA – meka voda, DEMI – demineralizirana voda). Na grafičkom prikazu rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanih mjerenja ±SD; **** (*p* < 0,0001), *** (0,0001 < *p* < 0,001), ** (0,001 < *p* < 0,01).

Kod spoja TMPyP3-CH₃ u demineraliziranoj vodi bez izlaganja svjetlosti (Slika 23B. – DEMI, mrak) došlo je do smanjenja CFU vrijednosti za 3 log u

odnosu na kontrolu. Potpuna inaktivacije biofilma uočena je u mekoj i demineraliziranoj vodi kod spojeva TMPyP3 i TMPyP3-CH₃ (Slika 23A, B – MEKA, DEMI, svjetlo) te kod spoja TMPyP3-C₁₇H₃₅ u mekoj vodi (Slika 23C. – MEKA, svjetlo). Nakon tretmana spojem TMPyP3 i izlaganja svjetlosti u tvrdoj vodi došlo je do smanjenja CFU vrijednosti za više od 50% (Slika 23A. – TVRDA, svjetlo). Kod spoja TMPyP3-C₁₇H₃₅ u tvrdoj vodi nije bilo značajne razlike u odnosu na rezultat dobiven za upola manju koncentraciju (Slika 22C. i 23C. - TVRDA, svjetlo). Nakon povećanja koncentracije za spoj TMPyP3-CH₃ i osvjetljavanja došlo je do smanjenja CFU vrijednosti za oko 1 log u tvrdoj vodi u odnosu na kontrolu (Slika 23B. – TVRDA, svjetlo).

5. RASPRAVA

Ispitivanjem minimalne efektivne koncentracije fotosenzibilizatora TMPyP3, TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅ u uzorcima voda različitih tvrdoća uočena je toksičnost u mraku nakon 30-minutne inkubacije u demineraliziranoj vodi kod sva tri spoja (6,25 μM za TMPyP3 i 3,125 μM za TMPyP3-CH₃ i TMPyP3-C₁₇H₃₅) te u mekoj vodi kod spoja TMPyP3-C₁₇H₃₅ (6,25 μM). Iako je inkubacija provedena u mraku i mikrotitarske pločice su bile zamotane u plastičnu foliju nije bilo moguće provesti čitavo istraživanje u potpunom mraku, pogotovo za vrijeme pripreme uzoraka za inkubaciju pa je to kratkoročno izlaganje svjetlosti, iako u zamračenoj prostoriji, moglo utjecati na dobiveni rezultat za toksičnost u mraku. Nakon osvjetljavanja MEK vrijednosti su se smanjile za sva tri spoja tako da su u tvrdoj, mekoj i demineraliziranoj vodi MEK vrijednosti za trikationske fotosenzibilizatore iznosile 6,25 μM, 3,125 μM i 0,78 μM dok su za tetrakationski fotosenzibilizator te vrijednosti bile dva ili četiri puta veće, odnosno 12,5 μM, 6,25 μM i 3,125 μM. U radu u kojemu su prethodno ispitivane MEK vrijednosti u riječkoj vodovodnoj vodi (prema tvrdoći vode usporediva s mekom vodom u ovome radu) na soju *L. pneumophila* 130b pokazano je da je spoj TMPyP3-C₁₇H₃₅ toksičan u mraku (>1,56 μM) u usporedbi s druga dva spoja (>12,5 μM) te su utvrđene MEK vrijednosti iznosile 0,195 μM za TMPyP3, 0,39 μM za TMPyP3-CH₃ i 0,0024 μM za TMPyP3-C₁₇H₃₅ [37]. Toksičnost u mraku mogla bi biti objašnjena interakcijama između pozitivnih naboja kationskih fotosenzibilizatora i negativnih naboja lipopolisaharida na površini Gram-negativne bakterije *L. pneumophila* što bi izazvalo samopromovirani unos spojeva u stanicu [37].

Budući da su eksperimenti provedeni na Gram-negativnoj bakteriji *L. pneumophila* ima smisla da su korišteni kationski porfirini kao fotosenzibilizatori jer je poznato da su anionski, kationski i neutralni fotosenzibilizatori učinkoviti protiv Gram-pozitivnih bakterija, ali protiv Gram-

negativnih bakterija pokazali su se učinkoviti samo fotosenzibilizatori s pozitivnim nabojem [3], [27]. Ove razlike mogu biti objašnjene razlikama u građi Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Gram-pozitivne bakterije imaju deblju, ali poroznu vanjsku membranu koju čine međusobno povezani slojevi peptidoglikana koji okružuju staničnu membranu, dok Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana i kretanje molekula kroz stanice regulira vanjska membrana koja je karakteristična po lipopolisaharidnom (LPS) sloju koji je negativno nabijen. Kada bi se protiv Gram-negativnih bakterija koristili neutralni ili anionski fotosenzibilizatori trebale bi se bakterije prethodno tretirati membranskim disruptorima kao što su polietilenimin, polimiksin B nonapeptid, poli-L-lizin i dr. kako bi se omogućio ulazak fotosenzibilizatora u stanicu, što je izbjegnuto korištenjem kationskih fotosenzibilizatora [28]. Zbog svojih pozitivnih naboja korišteni fotosenzibilizatori mogli su ući u bakterijske stanice bez prethodnog tretiranja membranskim disruptorima i to putem samopromoviranog unosa u stanice koji se zasniva na interakcijama između pozitivnih naboja na fotosenzibilizatorima i negativnih naboja na lipopolisaharidnom sloju zbog kojih dolazi do zamijene kationskih fotosenzibilizatora i dvovalentnih kationa Ca^{2+} i Mg^{2+} koji su usidreni na LPS. Takva zamjena oslabljuje vanjsku membranu i povećava permeabilnost zbog čega se može vezati još više molekula fotosenzibilizatora. Na taj način narušava se organizacija membrane, povećava se permeabilnost i povećava se unos fotosenzibilizatora sa svakim novim vezanjem [27]. Broj pozitivnih naboja također može utjecati na učinkovitost fotodinamičke inaktivacije. Broj naboja povećava amfifilni karakter fotosenzibilizatora i s tim i njihov afinitet prema bakterijama što pomaže u akumulaciji u stanicama [39]. Povećanjem broja naboja povećava se aktivnost fotosenzibilizatora protiv Gram-negativnih bakterija, pa su u istraživanju na *E. coli* koje su proveli Simões *et al.* pokazano da su tri- i tetrakationski fotosenzibilizatori bili učinkovitiji od mono- i dikationskih

fotosenzibilizatora [39]. Fotosenzibilizator sličan tetrakationskom TMPyP3 pokazao se učinkovitiji protiv *E. coli* nego trikationski spoj te je ustanovljeno da se tetrakationski porfirin više nakupljao unutar stanice, dok se trikationski spoj vezao za staničnu membranu. Tetrakationski spojevi ostvarili su jake interakcije s nukleinskim kiselinama i izazvali fotooštećenja na plazmidnoj DNA, dok su trikationski porfirini djelovali na lipide staničnih membrana [37], [40]. U ovom istraživanju je moguće da poboljšani anti-adhezijski i anti-biofilm učinak TMPyP3, nije posljedica četiri naboja u odnosu na druga dva porfirina koja imaju tri pozitivna naboja, već je moguće da je taj učinak izazvan dva puta većom koncentracijom spoja koja se koristila u odnosu na trikationske porfirine. Bolja učinkovitost amfifilnog trikationskog porfirina TMPyP3-C₁₇H₃₅ u odnosu na hidrofilni trikationski porfirin TMPyP3-CH₃ može se pripisati njegovoj većoj lipofilnosti. Moguće je da dugački alkilni lanac povećava afinitet porfirina prema membrani te stabilizira njegovo vezanje na membranu što dovodi do slabljenja membrane i povećanja permeabilnosti i samim time veće akumulacije spoja u bakterijskim stanicama što rezultira povećanom fotocitotoksičnom aktivnošću [37], [41].

Prisutnost iona u vodi može utjecati na sposobnost *L. pneumophila* za kolonizaciju pa tako dvovalentni kationi pogoduju kolonizaciji dok je nanočestice i bakar ometaju. Pokazano je da kalcijevi i magnezijevi kationi olakšavaju vezanje *L. pneumophila* za abiotičke površine. Povećane količine cinka, mangana i magnezija povezane su s povećanjem kontaminacije bakterijom *L. pneumophila*, a prisutnost cinka povećava mogućnost za vezanje bakterija za stanice domaćina kao što su epitelne stanice u plućima ljudi zbog čega je moguće da kationi igraju važnu ulogu i u adheziji bakterija i na biotičke površine [3]. Izlaganje već stvorenih biofilmova visokim koncentracijama kalcijevih iona poboljšalo je kohezivnost biofilma unakrsnim vezanjem biopolimera i vezanjem mikroorganizama jednih za druge. Dvovalentni ioni stvaraju mineralne nanose poznate i kao kamenac koji

ponekad spojeni i inkorporirani u biofilmove mogu utjecati na krutost i strukturu biofilma. U vodi koja je imala visoku koncentraciju kalcijevih i magnezijevih iona stvoren je biofilm koji je imao veliku količinu CaCO_3 i veliku krutost, dok u mekoj vodi i u vodi u kojoj je bio dodan polifosfat nastao je biofilm koji je sadržavao malo CaCO_3 i bio je niske krutosti. Velike količine kalcijevih iona mogu se unakrsno vezati s funkcionalnim grupama u izvanstaničnom matriksu ili s bakterijskim stanicama zbog čega dolazi do precipitacije CaCO_3 i integracije u biofilm. Takvi biofilmovi otporniji su na hidrauličko ispiranje i manje su porozni nego biofilmovi stvoreni u mekoj vodi. Polifosfati koji inhibiraju precipitaciju CaCO_3 mogu povećati rast bakterija i stvoriti deblje biofilmove od biofilmova stvorenih u mekoj vodi koji su i dalje slabe krutosti i nisu otporni na hidrauličko ispiranje te bi uporaba polifosfata mogla smanjiti kvalitetu vode za piće i povećati otpuštanje patogena iz biofilma [42]. Za formaciju biofilma potrebna je određena količina kalcijevih iona pa bi korištenje meke vode u umjetno stvorenim sustavima moglo biti korišteno kao jedan od mehanizama za prevenciju akumulacije biofilma. Ioni magnezija i kalcija mogli bi izravno inicirati stvaranje biofilma preko elektrostatskih interakcija između dvovalentnih iona i biofilma te neizravno modificirajući proces vezanja stanica [43]. Što se tiče utjecaja tvrdoće vode na rast bakterije *L. pneumophila* ne može se definitivno reći kakav je taj učinak jer su rezultati istraživanja kontradiktorni tj. u nekim istraživanjima nije utvrđena nikakva povezanost u nekima je utvrđena pozitivna, a u nekima negativna povezanost između kolonizacije bakterijom *L. pneumophila* i tvrdoće vode [44]–[46]. U istraživanju koje su proveli Bargellini *et al.* ustanovili su da tvrdoća vode nije imala nikakav utjecaj na rast bakterija *L. pneumophila*. U ovom istraživanju uočeno je malo, gotovo zanemarivo povećanje u sposobnosti za adheziju na polistiren (Slika 18.) i stvaranje biofilma (Slika 21.) s povećanjem tvrdoće vode. Najveća toksičnost u mraku kao i najbolja aktivnost nakon osvjetljavanja uočena je u demineraliziranoj

vodi što bi moglo ukazivati na to da tvrdoća vode može smanjiti učinkovitost fotodinamičke inaktivacije.

6. ZAKLJUČAK

Uočen je mali, gotovo zanemariv porast u sposobnosti bakterija *L. pneumophila* za adheziju na polistiren i stvaranje biofilma s porastom tvrdoće vode i u uzorcima koji su izlagani svjetlosti i onima koji su čuvani u mraku. Sva tri kationska porfirina pokazala su se učinkovita u inaktivaciji Gram-negativne bakterije *L. pneumophila*. Tetrakationski porfirin TMPyP3 imao je dva puta veću MEK vrijednost u mekoj vodi nego trikationski porfirini te je u svim eksperimentima korištena dva puta veća koncentracija tetrakationskog porfirina nego trikationskih porfirina što je moglo utjecati na rezultate i prikaz njegove učinkovitosti. Između dva trikationska porfirina, učinkovitiji je amfifilni porfirin TMPyP3-C₁₇H₃₅ od hidrofilnog trikationskog porfirina TMPyP3-CH₃, ali je primijećena i veća toksičnost u mraku. Razliku u učinkovitosti moguće je objasniti amfifilnim karakterom TMPyP3-C₁₇H₃₅ gdje dolazi do boljeg vezanja porfirina za stanice bakterija radi hidrofobne modifikacije. Najveća toksičnost u mraku i najbolja učinkovitost inaktivacije nakon osvjetljenja uočena je u demineraliziranoj vodi što znači da bi tvrdoća vode mogla utjecati na učinkovitost fotodinamičke inaktivacije. Toksičnosti u mraku moglo je doprinijeti i kratkotrajno izlaganje svjetlosti za vrijeme pripreme uzoraka. Budući da su rezultati drugih istraživanja koja povezuju tvrdoću vode i rast *L. pneumophila* kontradiktorni, a sama povezanost tvrdoće vode i učinkovitosti fotodinamičke inaktivacije je nova tema u istraživanjima potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdila povezanost.

7. LITERATURA

- [1] S. Kalenić, *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2013.
- [2] N. Jomehzadeh, M. Moosavian, M. Saki, and M. Rashno, "Legionella and legionnaires' disease: An overview," *J. Acute Dis.*, vol. 8, Dec. 2019, doi: 10.4103/2221-6189.272853.
- [3] M. Abdel-Nour, C. Duncan, D. E. Low, and C. Guyard, "Biofilms: the stronghold of Legionella pneumophila.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 11, pp. 21660–21675, Oct. 2013, doi: 10.3390/ijms141121660.
- [4] M. Mušković, I. Čavar, A. Lesar, M. Lončarić, N. Malatesti, and I. Gobin, "Photodynamic Inactivation of Legionella pneumophila Biofilm Formation by Cationic Tetra- and Tripyridylporphyrins in Waters of Different Hardness.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 16, Aug. 2021, doi: 10.3390/ijms22169095.
- [5] M. Jelovica *et al.*, "In Vitro Photodynamic Activity of N-Methylated and N-Oxidised Tripyridyl Porphyrins with Long Alkyl Chains and Their Inhibitory Activity in Sphingolipid Metabolism," *ChemMedChem*, vol. 13, no. 4, pp. 360–372, Feb. 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700748>.
- [6] J. Sobczyński and A. Polski, "Chapter 21 - Nanocarriers for Photosensitizers for Use in Antimicrobial Photodynamic Therapy," in *Micro and Nano Technologies*, A. Ficaí and A. M. B. T.-N. for A. T. Grumezescu, Eds. Elsevier, 2017, pp. 481–502.
- [7] Z. Huang, "A review of progress in clinical photodynamic therapy.," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 4, no. 3, pp. 283–293, Jun. 2005, doi: 10.1177/153303460500400308.
- [8] T. J. Dougherty, "An update on photodynamic therapy applications.," *J. Clin. Laser Med. Surg.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–7, Feb. 2002, doi: 10.1089/104454702753474931.
- [9] E. Alves, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, Â. Cunha, H. Nadais, and A. Almeida, "Potential applications of porphyrins in photodynamic inactivation beyond the medical scope," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 22, pp. 34–57, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.003>.
- [10] S. Kwiatkowski *et al.*, "Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 106, pp. 1098–1107, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.

- [11] U. Chilakamarthi and L. Giribabu, "Photodynamic Therapy: Past, Present and Future.," *Chem. Rec.*, vol. 17, no. 8, pp. 775–802, Aug. 2017, doi: 10.1002/tcr.201600121.
- [12] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 4, pp. 279–293, Dec. 2004, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- [13] I. Yoon, J. Z. Li, and Y. K. Shim, "Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy.," *Clin. Endosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 7–23, Jan. 2013, doi: 10.5946/ce.2013.46.1.7.
- [14] R. R. Allison and K. Moghissi, "Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms," *Clin. Endosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 24–29, Jan. 2013, doi: 10.5946/ce.2013.46.1.24.
- [15] N. Malatesti, I. Munitic, and I. Jurak, "Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitizers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents.," *Biophys. Rev.*, vol. 9, no. 2, pp. 149–168, Apr. 2017, doi: 10.1007/s12551-017-0257-7.
- [16] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, "Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, no. 5, pp. 1053–1074, 2009, doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x.
- [17] R. R. Allison and C. H. Sibata, "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 7, no. 2, pp. 61–75, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001.
- [18] S. Saito and A. Osuka, "Expanded Porphyrins: Intriguing Structures, Electronic Properties, and Reactivities," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 50, no. 19, pp. 4342–4373, May 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201003909>.
- [19] L. G. Arnaut, "Chapter 5 - Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy," in *Inorganic Photochemistry*, vol. 63, R. van Eldik and G. B. T.-A. in I. C. Stochel, Eds. Academic Press, 2011, pp. 187–233.
- [20] J. Sandland, N. Malatesti, and R. Boyle, "Porphyrins and related macrocycles: Combining photosensitization with radio- or optical-imaging for next generation theranostic agents.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 23, pp. 281–294, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.06.023.
- [21] P. Mandal, M. Goto, and M. Sasaki, "Removal of Nickel and Vanadium

- from Heavy Oils Using Supercritical Water," *J. Japan Pet. Inst.*, vol. 57, pp. 18–28, Mar. 2014, doi: 10.1627/jpi.57.18.
- [22] M. M. Kim and A. Darafsheh, "Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 96, no. 2, pp. 280–294, Mar. 2020, doi: 10.1111/php.13219.
- [23] O. Chepurna *et al.*, "LED-based portable light source for photodynamic therapy," *Optics in Health Care and Biomedical Optics IX*, vol. 11190. SPIE, 2019, doi: 10.1117/12.2541774.
- [24] L. Brancaleon and H. Moseley, "Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy.," *Lasers Med. Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 173–186, 2002, doi: 10.1007/s101030200027.
- [25] S. Banfi *et al.*, "Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 85, no. 1, pp. 28–38, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.04.003>.
- [26] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 14th ed. San Francisco: Pearson; 14 edition, 2015.
- [27] T. Dai, Y.-Y. Huang, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy for localized infections--state of the art.," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 6, no. 3–4, pp. 170–188, 2009, doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
- [28] S. George, M. R. Hamblin, and A. Kishen, "Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria.," *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.*, vol. 8, no. 6, pp. 788–795, Jun. 2009, doi: 10.1039/b809624d.
- [29] A. W. Maresso, "The Form and Function of a Bacterial Pathogen BT - Bacterial Virulence: A Conceptual Primer," A. W. Maresso, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 7–18.
- [30] M. G. Rittig, B. Wilske, and A. Krause, "Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand?," *Microbes Infect.*, vol. 1, no. 9, pp. 727–735, 1999, doi: [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80074-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80074-4).
- [31] B. S. Fields, R. F. Benson, and R. E. Besser, "Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 3, pp. 506–526, Jul. 2002, doi: 10.1128/cmr.15.3.506-526.2002.
- [32] A. Pinto, M. Cerqueira, M. Bañobre-López, L. Pastrana, and S. Sillankorva, "Bacteriophages for Chronic Wound Treatment: From Traditional to Novel Delivery Systems," *Viruses*, vol. 12, p. 235, Feb.

- 2020, doi: 10.3390/v12020235.
- [33] A. Abu Khweek and A. O. Amer, "Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, p. 38, 2018, doi: 10.3389/fcimb.2018.00038.
- [34] M. Koubar, M.-H. Rodier, and J. Frère, "Involvement of minerals in adherence of *Legionella pneumophila* to surfaces," *Curr. Microbiol.*, vol. 66, no. 5, pp. 437–442, May 2013, doi: 10.1007/s00284-012-0295-0.
- [35] A. Pereira, A. R. Silva, and L. F. Melo, "Legionella and Biofilms-Integrated Surveillance to Bridge Science and Real-Field Demands," *Microorganisms*, vol. 9, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9061212.
- [36] N. Malatesti *et al.*, "Synthesis, characterisation and in vitro investigation of photodynamic activity of 5-(4-octadecanamidophenyl)-10,15,20-tris(N-methylpyridinium-3-yl)porphyrin trichloride on HeLa cells using low light fluence rate," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 15, pp. 115–126, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.003>.
- [37] A. Lesar *et al.*, "Cationic Porphyrins as Effective Agents in Photodynamic Inactivation of Opportunistic Plumbing Pathogen &i&t;Legionella pneumophila&t;/i&t;," *International journal of molecular sciences*, vol. 21, no. 15. Bioinstitut d.o.o., R. Steinera 7, 40000 Čakovec, Croatia., 2020, doi: 10.3390/ijms21155367.
- [38] N. Carson, "File:96-Well plate.svg," 2020. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:96-Well_plate.svg.
- [39] C. Simões *et al.*, "Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins - The charge number and charge distribution effects," *Catal. Today*, vol. 266, pp. 197–204, 2016, doi: 10.1016/j.cattod.2015.07.031.
- [40] A. N. Hurst *et al.*, "Influence of cationic meso-substituted porphyrins on the antimicrobial photodynamic efficacy and cell membrane interaction in *Escherichia coli*," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 1, 2019, doi: 10.3390/ijms20010134.
- [41] E. Alves *et al.*, "Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins," *BMC Microbiol.*, vol. 9, p. 70, Apr. 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-70.
- [42] Y. Shen *et al.*, "Effect of divalent ions and a polyphosphate on composition, structure, and stiffness of simulated drinking water biofilms," *npj Biofilms Microbiomes*, vol. 4, no. 1, p. 15, 2018, doi: 10.1038/s41522-018-0058-1.

- [43] L. Brouse, R. Brouse, and D. Brouse, "Natural Pathogen Control Chemistry to Replace Toxic Treatment of Microbes and Biofilm in Cooling Towers.," *Pathog. (Basel, Switzerland)*, vol. 6, no. 2, Mar. 2017, doi: 10.3390/pathogens6020014.
- [44] S. Bonetta, S. Bonetta, E. Ferretti, F. Balocco, and E. Carraro, "Evaluation of Legionella pneumophila contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods.," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 108, no. 5, pp. 1576–1583, May 2010, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04553.x.
- [45] A. Lasheras, H. Boulestreau, A.-M. Rogues, C. Ohayon-Courtes, J.-C. Labadie, and J.-P. Gachie, "Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of Legionella species in hospital water systems.," *Am. J. Infect. Control*, vol. 34, no. 8, pp. 520–525, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.ajic.2006.03.007.
- [46] J. Kusnetsov, E. Torvinen, O. Perola, T. Nousiainen, and M.-L. Katila, "Colonization of hospital water systems by legionellae, mycobacteria and other heterotrophic bacteria potentially hazardous to risk group patients.," *APMIS*, vol. 111, no. 5, pp. 546–556, May 2003, doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.1110503.x.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Gobin i ko-mentorici izv. prof. dr. sc. Neli Malatesti koje su dijeleći sa mnom svoje znanje i iskustvo, usmjeravajući me i dajući savjete pomogle u izradi eksperimentalnog rada i pisanja diplomskog rada. Uz svoju mentoricu i ko-mentoricu zahvaljujem se Martini Mušković, mag. med. chem i svima ostalima koji su sudjelovali u izradi, pisanju i objavljivanju moga prvog znanstvenog članka.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori i motivaciji tijekom cijeloga života i studiranja. Također se zahvaljujem svojim prijateljima koji su svojom podrškom olakšali i uljepšali školovanje.

8. ŽIVOTOPIS

Iva Ćavar

☎ (+387) 63563009

☎ (+385) 976531619

Datum rođenja: 16.6.1997.

✉ **E-adresa:** ivacavar1997@gmail.com

📍 **Adresa:** Knešpolje bb, 88220 Široki Brijeg (Bosna i Hercegovina)

OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

Visoka stručna sprema: magistra medicinske kemije

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju [2019 – Trenutačno]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

<http://www.biotech.uniri.hr/hr/studiji/diplomski-sveucilisni-studij-medicinska-kemija.html>

Viša stručna sprema: sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) biotehnologije i istraživanja lijekova

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju [2016 – 2019]

Adresa: Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

<http://www.biotech.uniri.hr/hr/studiji/preddiplomski-sveucilisni-studij-biotehnologija-i-istrazivanje-lijekova.html>

Konačna ocjena : 4.629, cum laude

Završni rad: "Tripiridilporfirin u fotodinamičkoj inaktivaciji biofilma" pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nele Malatesti i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Gobin

Srednja stručna sprema

Gimnazija fra Dominika Mandića [2012 – 2016]

Adresa: Kardinala Alojzija Stepinca, 88220 Široki Brijeg (Bosna i Hercegovina)

<http://www.gimnazija-sb.com/>

Niža stručna sprema

Druga osnovna škola [2004 – 2012]

Adresa: Fra Didaka Buntića 27, 88220 Široki Brijeg (Bosna i Hercegovina)

www.20ssb.com

RADNO ISKUSTVO

Izrada eksperimentalnog diplomskog rada

Medicinski fakultet: Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju [10.2020. – 7.2021.]

Zemlja: Hrvatska

Istraživanje utjecaja kationskih porfirinskih fotosenzibilizatora u fotodinamičkoj inaktivaciji *L. pneumophila* u biofilmu u vodama različitih tvrdoća, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Gobin i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Nele Malatesti

Demonstrature u laboratoriju za mikrobiologiju

Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju [1.2020.]

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Izrada eksperimentalnog završnog rada

Medicinski fakultet: Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju [2018 – 2019]

Mjesto: Rijeka

Zemlja: Hrvatska

Istraživanje utjecaja tripiridilporfirina kao fotosenzibilizatora u fotodinamičkoj inaktivaciji biofilma *L. pneumophila* stvorenog u sterilnoj vodovodnoj vodi pri različitim temperaturama, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nele Malatesti i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Gobin

PUBLIKACIJE

Mušковиć, M.; Čavar, I.; Lesar, A.; Lončarić, M.; Malatesti, N.; Gobin, I. Photodynamic Inactivation of Legionella pneumophila Biofilm Formation by Cationic Tetra- and Tripyridylporphyrins in Waters of Different Hardness. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9095. <https://doi.org/10.3390/ijms22169095>

KONFERENCIJE I SEMINARI

19. kongres Europskog društva za fotobiologiju

[Salzburg, Austrija , 30.8.2021. – 03.9.2021.]

Poster-prezentacija na temu "Water hardness shows strong impact on the photodynamic activity of cationic pyridylporphyrins against *L. pneumophila* and biofilm"

Studentski kongres zaštite zdravlja – Sanitas (aktivni sudionik)

[Rijeka, Hrvatska , 4.2019.]

Poster-prezentacija na temu "Razaranje biofilma *Legionella pneumophila* pomoću amfifilnog porfirina".

PROJEKTI

Opportunistički patogeni vodoopskrbnog sustava: novi izazov u obradi voda

[2018 – 2021]

Šifra: uniri-biomed-18-171

Priprema lipidnih konjugata piridilporfirina, njihova karakterizacija i fotodinamička aktivnost

[2018 – 2021]

Šifra: uniri-prirod-18-173

Znanosti iza objektivna

[10.2018. – 12.2018.]

Snimanje demonstracija pokusa iz kemije prema gradivu 7. i 8. razreda osnovne škole.

MREŽE I ČLANSTVA

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci

[Rijeka, Hrvatska, Trenutačno]

VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Rad u aseptičkim uvjetima i s bakterijskim kulturama

- znanje i vještine stečene kroz izradu eksperimentalnog dijela završnog i diplomskog rada

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici:

hrvatski

Drugi jezici:

engleski

SLUŠANJE C1 ČITANJE C1 PISANJE C1

GOVORNA PRODUKCIJA C1

GOVORNA INTERAKCIJA C1

njemački

SLUŠANJE A2 ČITANJE A2 PISANJE A2

GOVORNA PRODUKCIJA A2

GOVORNA INTERAKCIJA A2

DIGITALNE VJEŠTINE

Iskusna u radu sa Microsoft Office paketom (PowerPoint, Excel, Word) / Aktivno korištenje društvenih mreža i alata za komunikaciju (različite platforme) / Komunikacijski programi (Skype Zoom TeamViewer) / poznavanje programa PyMOL, Avogadro, ChemAxon Marvin, VMD, GAMESS, MacMOLPit / Videokonferencijske aplikacije

VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: B