



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**The susceptibility of trichophyton rubrum to photodynamic treatment**  
Smijs, G.M.T

**Citation**

Smijs, G. M. T. (2008, October 9). *The susceptibility of trichophyton rubrum to photodynamic treatment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13138>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13138>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft als doel huidinfecties veroorzaakt door de huidschimmel *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*) éénmalig effectief te behandelen met behulp van een fotodynamische behandeling (PDT).

PDT heeft betrekking op een behandeling, binnen een biologisch systeem, met een lichtgevoelige stof, de fotosensibilisator, in combinatie met licht en zuurstof en berust op het volgende principe. In aanwezigheid van licht van een geschikte golflengte zal de fotosensibilisator in staat zijn tot absorptie van dit licht en komt hierdoor op een hoger energieniveau terecht. De op deze wijze verkregen energie kan op verschillende manieren door de fotosensibilisator benut worden. Het optreden van een chemische reactie behoort tot de mogelijkheden. Hierbij geeft het aangeslagen molecuul zijn energie door aan een ander molecuul. In een biologisch systeem is dit meestal moleculaire zuurstof en kunnen twee verschillende typen reacties ontstaan, beiden leidend tot biologische schade. Genoemde reacties staan bekend als *type I* en *type II* reactie. In een *type I* reactie betreft het een overdracht van elektronen of waterstof, terwijl in een *type II* reactie een energie overdracht plaatsvindt waarbij een reactief kortlevend zuurstofdeeltje, singlet zuurstof ( $^1\text{O}_2$ ) ontstaat.

Door het toenemende optreden van bacteriële resistentie voor antibiotica, zou het gebruik van PDT een goed alternatief kunnen zijn voor de behandeling van gelokaliseerde huidinfecties. Ook de behandeling van wondinfecties zou hieronder kunnen vallen. Op dit moment is het bekend dat bij fotodynamische behandeling van micro-organismen  $^1\text{O}_2$  verantwoordelijk is voor schade. Doordat in een biologische omgeving de levensduur van  $^1\text{O}_2$  slechts 100 tot 250 ns bedraagt, zal de plaats van  $^1\text{O}_2$  productie in biologische systeem bepalend zijn voor de plaats van het schadelijke effect. Cruciaal voor het welslagen van een fotodynamische behandeling is de binding van de fotosensibilisator aan het biologische doel.

Binnen dermatologie is het gebruik van PDT uitgebreid onderzocht, echter nog zeer beperkt voor de behandeling van oppervlakkige huidschimmelinfecties. Huidschimmels leven niet alleen in de huid maar komen ook voor in haren en nagels. Al deze weefsels bezitten namelijk keratine. Het is dit keratine waarop een huidschimmel in staat is te groeien en daarmee een infectie te veroorzaken. Deze infecties staan ook wel bekend onder de naam tinea, met daarachter een verwijzing naar het lichaamsdeel waar de infectie zich bevindt.

Tot op heden zijn er verschillende huidschimmels onderworpen aan PDT waarbij

— regel 1  
 — regel 2  
 — regel 3  
 — regel 4  
 — regel 5  
 — regel 6  
 — regel 7  
 — regel 8  
 — regel 9  
 — regel 10  
 — regel 11  
 — regel 12  
 — regel 13  
 — regel 14  
 — regel 15  
 — regel 16  
 — regel 17  
 — regel 18  
 — regel 19  
 — regel 20  
 — regel 21  
 — regel 22  
 — regel 23  
 — regel 24  
 — regel 25  
 — regel 26  
 — regel 27  
 — regel 28  
 — regel 29  
 — regel 30  
 — regel 31  
 — regel 32  
 — regel 33  
 — regel 34  
 — regel 35  
 — regel 36  
 — regel 37  
 — regel 38  
 — regel 39

regel 1  
regel 2  
regel 3  
regel 4  
regel 5  
regel 6  
regel 7  
regel 8  
regel 9  
regel 10  
regel 11  
regel 12  
regel 13  
regel 14  
regel 15  
regel 16  
regel 17  
regel 18  
regel 19  
regel 20  
regel 21  
regel 22  
regel 23  
regel 24  
regel 25  
regel 26  
regel 27  
regel 28  
regel 29  
regel 30  
regel 31  
regel 32  
regel 33  
regel 34  
regel 35  
regel 36  
regel 37  
regel 38  
regel 39

verschillende fotosensibilisatoren werden uitgetest, zoals onder andere methyleen blauw en phthalocyanine derivaten. Een complete schimmel dood werd echter niet aangetoond.

In dit onderzoek wordt als fotosensibilisator gebruik gemaakt van gesynthetiseerde chemische verbindingen, bekend onder de verzamelnaam porfyrynes. Het onderzoek focusteert zich verder op de meest hardnekkig te behandelen dermatofyete, *T. rubrum*.

***T. rubrum* gekweekt in suspensie blijkt gevoelig voor PDT met porfyryne fotosensibilisatoren (hoofdstuk 2)**

Gezien de beperkingen van de huidige beschikbare behandelingsmethoden voor tinea, met name indien veroorzaakt door *T. rubrum*, is onderzoek gestart naar een mogelijke gevoeligheid van *T. rubrum* voor PDT.

*T. rubrum* werd hiertoe in een vloeibaar medium gekweekt en als zodanig behandeld met verschillende porfyryne fotosensibilisatoren in combinatie met zichtbaar licht. Het aldus gevonden PDT effect werd vergeleken met het effect gevonden voor andere, klassieke fotosensibilisatoren.

Voor deze laatste categorie fotosensibilisatoren werd slechts een groeivertragend effect waargenomen, terwijl voor met name twee porfyrynes, Sylsens B en DP mme, volledige schimmeldood werd verkregen.

***Het gebruik van rood licht blijkt effectief te zijn als onderdeel van een porfyryne PDT van T. rubrum : zowel mycelium als sporen blijken gevoelig voor de behandeling (hoofdstuk 3)***

Aangezien huidschimmels ook vaak te vinden zijn in de diepere haarfollikels zouden fotosensibilisatoren die gebruik kunnen maken van rood licht aan te bevelen zijn. Rood licht is in staat om dieper in de huid door te dringen en dus ook in de haarfollikels. Bovendien zou het gebruik van rood licht bij succes een goed perspectief kunnen bieden voor de fotodynamische behandeling van de veel voorkomende schimmelinfectie van de nagel (bekend als onychomycose). Deze wordt meestal veroorzaakt door *T. rubrum*.

Bij deze studie werden suspensies van de schimmel en zijn sporen (de microconidia) behandeld met PDT met rood licht. Sylsens B en DP mme werden hierbij als fotosensibilisator gebruikt en het verkregen resultaat werd vergeleken met het resultaat gevonden met een nieuw gesynthetiseerde porfyryne verbinding, QDD. Deze

laatste porfyriene verbinding is in staat om meer rood licht te absorberen dan Sylsens B en DP mme en zou theoretisch dus met rood licht een hoge(re) PDT effectiviteit moeten geven.

Dit werd echter niet gevonden; QDD gaf slechts een groeivertragend effect. Voor dit groeivertragende effect bleek ook nog eens een veel hogere concentratie (10 maal zo hoog) nodig te zijn dan tot nu toe gebruikelijk voor Sylsens B. Voor deze laatste verbinding en DP mme werd wel ten opzichte van zowel schimmel mycelium als microconidia (beide getest in oplossing) een volledig dodend effect aangetoond.

Vermoedelijk speelt bij het verkregen resultaat de aangetoonde foto-instabiliteit van QDD een geringe rol. Hierbij zal deze verbinding bij belichting zelf schade ondervinden en daardoor steeds minder licht kunnen absorberen. Aannemelijker is in dit geval echter het ontbreken van een geschikte bindingscapaciteit van het neutrale QDD molecule. Zowel Sylsens B als DP mme zijn geladen moleculen. Sylsens B heeft een positieve lading en DP mme een negatieve. Dit maakt het voor deze verbindingen makkelijk mogelijk om bijvoorbeeld aan de schimmelwand te binden.

***Ontwikkeling van een nieuw ex vivo model om de PDT effectiviteit van porfyrienes te testen ten opzichte van T. rubrum groeiend op geïsoleerde humaan huidoppervlak (hoofdstuk 4)***

Door de verkregen succesvolle resultaten voor de PDT met Sylsens B en DP mme van *T. rubrum* gekweekt in een vloeibaar medium hebben wij ons de vraag gesteld in hoeverre dit resultaat ook bereikt zou kunnen worden in een situatie vergelijkbaar met de klinische situatie.

Om hier achter te komen werd een *ex vivo* model ontwikkeld. In dit model werd gebruik gemaakt van het hoornlaagje van humane huid, het stratum corneum (SC). Door op dit stukje SC de sporen van *T. rubrum* te enten en deze uit te laten groeien bij 28°C ontstaat een situatie die lijkt op de klinische situatie.

De opzet van de experimenten met fotosensibilisatoren was zodanig dat de fotodynamische behandeling met rood licht plaatsvond op verschillende tijdstippen na enting van de schimmel op het SC.

Het eerste in het oog springende resultaat bleek de geringere gevoeligheid van *T. rubrum* voor PDT onder deze *ex vivo* omstandigheden. Om hetzelfde schimmeldodend effect te verkrijgen bleek een veel hogere fotosensibilisator concentratie nodig te zijn. De aanhechting van de schimmel aan huid, een mechanisch proces wat een rol speelt bij het ziekte proces in een klinische situatie, zou een rol kunnen spelen in de lagere

— regel 1  
 — regel 2  
 — regel 3  
 — regel 4  
 — regel 5  
 — regel 6  
 — regel 7  
 — regel 8  
 — regel 9  
 — regel 10  
 — regel 11  
 — regel 12  
 — regel 13  
 — regel 14  
 — regel 15  
 — regel 16  
 — regel 17  
 — regel 18  
 — regel 19  
 — regel 20  
 — regel 21  
 — regel 22  
 — regel 23  
 — regel 24  
 — regel 25  
 — regel 26  
 — regel 27  
 — regel 28  
 — regel 29  
 — regel 30  
 — regel 31  
 — regel 32  
 — regel 33  
 — regel 34  
 — regel 35  
 — regel 36  
 — regel 37  
 — regel 38  
 — regel 39

regel 1  
regel 2  
regel 3  
regel 4  
regel 5  
regel 6  
regel 7  
regel 8  
regel 9  
regel 10  
regel 11  
regel 12  
regel 13  
regel 14  
regel 15  
regel 16  
regel 17  
regel 18  
regel 19  
regel 20  
regel 21  
regel 22  
regel 23  
regel 24  
regel 25  
regel 26  
regel 27  
regel 28  
regel 29  
regel 30  
regel 31  
regel 32  
regel 33  
regel 34  
regel 35  
regel 36  
regel 37  
regel 38  
regel 39

gevoeligheid van de schimmel voor de PDT. We vonden dat kort (8 uur) na enting de gevoeligheid voor PDT hoger was dan wanneer de schimmel op een later tijdstip (bijvoorbeeld 72 uur na enting) werd behandeld met PDT. Het stadium waarin zich nog sporen al dan niet ontkiemd bevonden (8 uur na enting) bleek het meest gevoelig te zijn voor PDT. Latere stadia (getest werd tot 72 uur na enting) waarbij voornamelijk volledig ontwikkeld mycelium aanwezig is bleken moeilijker te behandelen.

Het medium waarin (voorafgaand aan de belichtingsperiode) incubatie plaatsvond van het geïnfecteerde SC met fotosensibilisator bleek een opmerkelijke rol te spelen. Maakten we gebruik van Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) dan bleek de PDT activiteit van Sylsens B en DP mme vergelijkbaar. Vervanging van het DMEM medium door gedestilleerd water bleek de PDT effectiviteit van Sylsens B te verhogen en die van DP mme te verlagen. Factoren zoals de pH van het water en het ontbreken van een groot aantal ionen in het water zouden hiervoor verantwoordelijk kunnen zijn.

Toepassing van fluorescentie microscopie toonde aanwezigheid van Sylsens B aan de buitenkant van de schimmelwand in geval van een donker en niet succesvolle fotodynamische behandeling. Na een effectieve PDT bleek Sylsens B evens binnen de schimmelwand aantoonbaar.

Belangrijke conclusies uit dit onderzoek waren de afhankelijkheid van de PDT gevoeligheid van het *T. rubrum* groeistadium.

***Lage ionensterkte en pH blijken de PDT effectiviteit van de positief geladen fotosensibilisator Sylsens B te verhogen (hoofdstuk 5)***

In dit gedeelte van de studie hebben we geprobeerd om een verklaring te vinden voor de gevonden resultaten en geprobeerd het mechanisme te ontrafelen verantwoordelijk voor de PDT van *T. rubrum* met rood licht in de *ex vivo* situatie.

Hierbij werd een groot aantal factoren onderzocht die van invloed zouden kunnen zijn op de PDT met rood licht van *T. rubrum*, aangehecht aan humaan SC. Belangrijkste onderzochte factoren waren de pH en ionensterkte van het incubatiemedium, fotochemische eigenschappen van de fotosensibilisatoren en de invloed van een keratinase remmer. Keratinase is een enzym dat door deze schimmel in grote hoeveelheid wordt gemaakt indien de schimmel uitsluitend keratine als voedingsbron tot zijn beschikking heeft. Derhalve speelt de productie van dit enzym in de voortgang van het ziekteproces in een klinische situatie een belangrijke rol. In deze situatie schakelt de schimmel, na aanhechting op de huid, over op een in de huid aanwezige voedingsbron (het keratine) door de productie van keratinase. Verloopt dit proces

goed dan is de infectie een feit.

Depositiefgeladenverbinding Sylsens B bleek, getest op 3 verschillende schimmelstadia (van spore tot mycelium), het beste resultaat te geven bij een lage ionensterkte en pH van 5.2. Voor alle geteste groeistadia werd een volledige dood van de schimmel verkregen, echter in geval van behandeling van het mycelium (72 uur na enting op het SC) werd schimmeldood in slechts 80 tot 90 % van de gevallen aangetoond.

Belangrijk bij de verklaring voor de gevonden resultaten is de mogelijkheid van Sylsens B om door zijn positieve lading bij de pH van 5.2 selectief te kunnen binden aan de schimmel en minder tot niet aan de huid zelf. Dit komt doordat wij in dit stukje onderzoek het bewijs hebben geleverd voor het feit dat er een klein pH gebied (tussen pH 3.5 en 5.5) is waarin de schimmel negatief en het SC meer neutraal geladen is.

Andere interessante uitkomsten uit dit onderzoek bleken het PDT effectiviteit verhogende effect van de keratinase remmer alsmede het aantonen van een pH effect binnen de factor groeistadium en een groeistadium effect binnen de factor pH.

***PDT met een dodelijke Sylsens B concentratie leidt tot grote veranderingen in de morfologie van de schimmelwand (hoofdstuk 6)***

Er is weinig onderzoek gedaan naar het effect van PDT op de morfologie van micro-organismen. Dit geldt zeker voor de schimmel *T. rubrum*.

Derhalve hebben wij een scanning elektronen microscopisch (SEM) onderzoek opgezet om inzicht te krijgen in het effect van een dodelijke dosis Sylsens B op de morfologie van de schimmel wand. Analoog aan ons eerdere onderzoek hebben we effecten bekeken in verschillende groeistadia van de schimmel en op verschillende tijdstippen na de behandeling. Om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen werd ook gekeken naar het effect van de effectieve dosis van rood licht alleen en naar het effect van Sylsens B in het donker.

Sylsens B zonder licht applicatie bleek duidelijk morfologische veranderingen teweeg te brengen, waaronder zwellingen en deuken zichtbaar op de schimmelwand. Echter slechts een effectieve PDT resulteerde in dusdanige morfologische schimmelwand veranderingen dat de schimmel dit niet kon overleven. Hierbij bleek uiteindelijk de schimmelwand volledig beroofd te zijn van zijn karakteristieke morfologie en uiteindelijk resulteerde de behandeling in leeggelopen platte schimmel elementen. De effecten bleken reeds zeer kort na de behandeling waarneembaar.

Bij een niet geheel effectieve PDT werd hernieuwde schimmelgroei zichtbaar op bepaalde plaatsen in een verder dode schimmel. Dit bleek voornamelijk aan de

— regel 1  
 — regel 2  
 — regel 3  
 — regel 4  
 — regel 5  
 — regel 6  
 — regel 7  
 — regel 8  
 — regel 9  
 — regel 10  
 — regel 11  
 — regel 12  
 — regel 13  
 — regel 14  
 — regel 15  
 — regel 16  
 — regel 17  
 — regel 18  
 — regel 19  
 — regel 20  
 — regel 21  
 — regel 22  
 — regel 23  
 — regel 24  
 — regel 25  
 — regel 26  
 — regel 27  
 — regel 28  
 — regel 29  
 — regel 30  
 — regel 31  
 — regel 32  
 — regel 33  
 — regel 34  
 — regel 35  
 — regel 36  
 — regel 37  
 — regel 38  
 — regel 39

regels 1-6: toppen van de hyphen het geval te zijn. Voor deze hyphen toppen bleek onder normale omstandigheden in het groeistadium corresponderend met 72 uur na enting (het lastigst te behandelen stadium) een afwijkende morfologie gevonden. Het zou kunnen dat hierdoor Sylsens B minder goed aan deze toppen kan binden en daardoor dus de PDT effectiviteit juist op deze plekken geringer is.

regels 7-8: ***Ontwikkeling van een testsysteem voor het testen op aanwezigheid van fotomutageniciteit ( hoofdstuk 7)***

regels 9-13: Door het toenemend gebruik van fotosensibilisatoren voor medische applicaties zou een goed testsysteem voor mogelijke mutagene potentie van fotosensibilisatoren noodzakelijk zijn. Hoewel er een groot aantal testsystemen voor mutageniciteit zijn en deze veelal ook zijn aangepast voor het gebruik van licht binnen het systeem, houden zij alle toch bepaalde beperkingen.

regels 14-17: Gebaseerd op een gevalideerd testsysteem, bekend als SMART, werd een systeem ontwikkeld voor de detectie van fotochemische genotoxiciteit. Hierbij werd methyleen blauw, waarvan bekend is dat het fotomutageniciteit kan induceren, gekozen als positieve controle.

regels 18-21: Binnen het door ons opgezette systeem, de Photo-SMART, werd voor de porfyriene Sylsens B onder de gegeven testomstandigheden een indicatie gevonden voor mutageniciteit, terwijl voor een andere porfyriene verbinding, hematoporfyrine, fotomutageniciteit afwezig bleek te zijn.

regels 22-24: ***De positief geladen porfyriene fotosensibilisator Sylsens B penetreert niet door humane huid ( hoofdstuk 8)***

regels 25-27: De huidige behandelingsmethoden voor tinea hebben toch vaak nog nadelen, voornamelijk het terugkeren van de infectie en hierdoor de lange duur van de behandeling worden als zeer vervelend ervaren.

regels 28-29: Een klinische toepassing van PDT voor tinea zou mogelijk een waardevolle toevoeging kunnen zijn op bestaande behandelingen.

regels 30-31: Voor gebruik van Sylsens B in een PDT applicatie is het niet nodig en zeker niet wenselijk dat Sylsens B door het huidoppervlak penetreert naar dieper gelegen huiddelen.

regels 32-39: Derhalve werd het penetratiegedrag van Sylsens B onderzocht onder verschillende omstandigheden. Zo werd gebruik gemaakt van gezonde huid, van SC geïnfecteerd met *T. rubrum* alsmede van chemisch beschadigd SC. De invloed van pH 5.2 in een voor PDT effectieve formulering (lage ionensterkte) met Sylsens B werd bekeken en

vergeleken met Sylsen B in een fosfaat gebufferde saline oplossing van pH 7.4. Deze laatste oplossing bezit een hoge ionensterkte.

Bij gezonde huid bleek er, zowel bij de pH 5.2 als de pH 7.4 formulering geen Sylsens B penetratie plaats te vinden. Beschadiging van het huidoppervlak door *T. rubrum* groei gaf bij de formulering van pH 7.4 aanleiding tot geringe Sylsens B penetratie, maar niet bij gebruik van onze succesvolle PDT formulering.

### **Slotopmerkingen en de toekomst**

Dit onderzoek heeft geleid tot het tot stand komen van een formulering die gebruikt kan worden om binnen één enkele fotodynamische behandeling tinea veroorzaakt door *T. rubrum* effectief te bestrijden. Deze formulering zou bij voorkeur moeten bestaan uit de positief geladen fotosensibilisator Sylsens B in een waterige oplossing met een pH waarde liggend tussen 4.5 en 5.7 (gepatenteerd pH gebied).

Met deze formulering is het mogelijk om de hardnekkige veroorzaker van tinea, *T. rubrum*, uit te schakelen door PDT met rood licht. Opmerkelijk hierbij is het sterke effect van deze behandeling op de schimmelsporen. Dit in tegenstelling tot het effect van de meeste huidige behandelingsmethodieken. Deze hebben veelal uitsluitend effect op de metabolisch actieve vorm van de schimmel, waarbij de sporen dan ongemoeid blijven. Indien deze in de huid achterblijven kunnen zij daar opnieuw een infectie starten.

Voor de verklaring van het grotere PDT effect met Sylsens B op de sporen van *T. rubrum* in vergelijking met het mycelium, zou het verschil in grootte in rol kunnen spelen. Aangezien binding noodzakelijk is voor het welslagen van PDT zou het zo kunnen zijn dat het totale mycelium oppervlak te groot is voor een effectieve fotosensibilisator binding. Voor het kleinere sporenoppervlak zou dit dan minder een probleem zijn. Daarnaast zou de hogere pigmentering van sporen ten opzichte van mycelium ook een rol kunnen spelen. Gedacht wordt hierbij aan de aanwezigheid van lichtabsorberende stoffen aanwezig op het oppervlak van sporen maar weer niet op dat van mycelium. Verder heeft de sporenwand ook een uniforme morfologie. Hierdoor zal overal dezelfde, effectieve bindingscapaciteit voor Sylsens B aanwezig zijn. De dikkere sporenwand doet duidelijk niet ter zake bij de hogere gevoeligheid voor PDT. Dit komt omdat Sylsens B bindt aan de buitenkant van de schimmelwand.

Het mycelium van *T. rubrum*, 72 uur na enting, is het minst gevoelig gebleken voor de PDT met 160  $\mu$ M Sylsens B en rood licht. Ook hier konden we een volledige dood van de schimmel bewerkstelligen, maar dit bleek slechts in 80 tot 90% het geval te zijn.

— regel 1  
 — regel 2  
 — regel 3  
 — regel 4  
 — regel 5  
 — regel 6  
 — regel 7  
 — regel 8  
 — regel 9  
 — regel 10  
 — regel 11  
 — regel 12  
 — regel 13  
 — regel 14  
 — regel 15  
 — regel 16  
 — regel 17  
 — regel 18  
 — regel 19  
 — regel 20  
 — regel 21  
 — regel 22  
 — regel 23  
 — regel 24  
 — regel 25  
 — regel 26  
 — regel 27  
 — regel 28  
 — regel 29  
 — regel 30  
 — regel 31  
 — regel 32  
 — regel 33  
 — regel 34  
 — regel 35  
 — regel 36  
 — regel 37  
 — regel 38  
 — regel 39



regel 1 \_\_\_\_\_  
regel 2 \_\_\_\_\_  
regel 3 \_\_\_\_\_  
regel 4 \_\_\_\_\_  
regel 5 \_\_\_\_\_  
regel 6 \_\_\_\_\_  
regel 7 \_\_\_\_\_  
regel 8 \_\_\_\_\_  
regel 9 \_\_\_\_\_  
regel 10 \_\_\_\_\_  
regel 11 \_\_\_\_\_  
regel 12 \_\_\_\_\_  
regel 13 \_\_\_\_\_  
regel 14 \_\_\_\_\_  
regel 15 \_\_\_\_\_  
regel 16 \_\_\_\_\_  
regel 17 \_\_\_\_\_  
regel 18 \_\_\_\_\_  
regel 19 \_\_\_\_\_  
regel 20 \_\_\_\_\_  
regel 21 \_\_\_\_\_  
regel 22 \_\_\_\_\_  
regel 23 \_\_\_\_\_  
regel 24 \_\_\_\_\_  
regel 25 \_\_\_\_\_  
regel 26 \_\_\_\_\_  
regel 27 \_\_\_\_\_  
regel 28 \_\_\_\_\_  
regel 29 \_\_\_\_\_  
regel 30 \_\_\_\_\_  
regel 31 \_\_\_\_\_  
regel 32 \_\_\_\_\_  
regel 33 \_\_\_\_\_  
regel 34 \_\_\_\_\_  
regel 35 \_\_\_\_\_  
regel 36 \_\_\_\_\_  
regel 37 \_\_\_\_\_  
regel 38 \_\_\_\_\_  
regel 39 \_\_\_\_\_

In de andere gevallen gaf deze PDT aanleiding tot een groeivertraging en zagen we op bepaalde plaatsen in de hyphen hernieuwde schimmelgroei optreden. Veelal bleek dit het geval te zijn bij de toppen van de hyphen. Bij gezonde hyphen bleek, met behulp van SEM, dat de toppen duidelijk een afwijkende morfologie bezaten in vergelijking met andere delen van de hyphen (waargenomen op 72 uur na enting). Het zou kunnen zijn dat het juist die afwijkende morfologie is die ervoor zorgt dat Sylsens B minder goed kan binden aan deze toppen. Hierdoor zouden deze delen minder gevoelig kunnen zijn voor PDT met Sylsens B. Dit maakt hergroei ter plekke mogelijk.

Om toch in alle 100% van de behandelingen een volledige schimmeldood te krijgen zou toevoeging van de keratinase remmer tijdens incubatie van *T. rubrum* met Sylsens B en oplossing kunnen bieden. Ook de hele PDT behandeling binnen 48 uur herhalen zou volgens de resultaten van het SEM onderzoek moeten leiden tot 100% volledige dood van de schimmel. De gedachtegang hierachter is dat uit de SEM studie duidelijk werd dat de gevonden afwijkende morfologie aan de toppen van de hyphen niet eerder zichtbaar was dan 72 uur na enting. Daarvoor bleken geen grote verschillen waarneembaar tussen de toppen en andere plekken in de hyphen. Recentelijk onderzoek wees uit dat inderdaad bij herhaling van de PDT met 160  $\mu\text{M}$  Sylsens B binnen 17 uur de 100% gehaald werd.

Wanneer we onze resultaten vergelijken met de literatuur bestaande over PDT van micro-organismen dan kunnen we zeggen dat ook bij deze schimmel de PDT beter werkt met een positief geladen fotosensibilisator dan met een negatief geladen en beiden werken weer beter dan een neutrale fotosensibilisator.

Binding van de fotosensibilisator, Sylsens B, aan de schimmelwand veroorzaakt een destabilisatie van de wand waardoor de schimmel al wat gevoeliger wordt voor de PDT en de productie van  $^1\text{O}_2$ . Door deze PDT treedt zodanige schade op aan de schimmelwand dat lekkages optreden. Op dat moment zal Sylsens B naar binnentreden en zal gedurende verdere belichting op nog meer plaatsten (ook binnenin de schimmel) schade plaatsvinden ten gevolge van productie van  $^1\text{O}_2$ .

Deze binding van Sylsens B met componenten aanwezig in het buitenste deel van de schimmelwand berust vermoedelijk op elektrostatische interacties tussen tegengestelde ladingen. In dit onderzoek is niet ingegaan op de aard van de bindingsplaats voor Sylsens B op de schimmelwand. Het vermoeden bestaat echter dat mogelijk negatief geladen fosforeenheden aanwezig zijn in de buitenste laag van de schimmelwand. De aanwezigheid van dergelijke negatief geladen groepen, waar ook AB aan bindt, is voor ander schimmels aangetoond. Wij hebben aangetoond dat

binding van AB aan *T. rubrum* de binding van Sylsens B verminderde.

Tot slot is het belangrijk te vermelden dat dit onderzoek heeft aangetoond dat door het bewerkstelligen van een selectieve binding van Sylsens B aan *T. rubrum* (gebruikmakend van de formulering met pH 5.2 en lage ionensterkte) niet alleen penetratie van Sylsens B naar dieper gelegen delen van de huid wordt voorkomen, maar hierdoor tevens gezonde oppervlakkige huidlagen beschermd worden tegen ongewenste PDT effecten.

Voor de nabije toekomst staan op de eerste plaats klinische PDT studies gepland met Sylsens B als fotosensibilisator in een waterige formulering van pH 5. Met dit doel voor ogen moet zo veel mogelijk gestreefd worden naar 100% schimmel dood in alle gevallen. Zoals aan aangegeven zou dit bereikt kunnen worden door aan de formulering de keratinase remmer toe te voegen of de gehele behandeling binnen 17 uur te herhalen. Beide opties zijn in de praktijk niet aan te bevelen. Beter is het om te kijken in hoeverre het gebruik van het licht en de lichtbron geoptimaliseerd kunnen worden. Sylsens B absorbeert slechts zeer gering in het golflengtegebied van het rode licht zoals dat hier gebruikt wordt. Hoewel dit toch leidt tot effectiviteit is het denkbaar dat wanneer er licht gebruikt zou worden waarin Sylsens B een hogere absorptie heeft, dit tot nog hogere effectiviteit zou kunnen leiden. Het is bekend dat Sylsens B beter absorbeert in het blauwe gedeelte van het spectrum (424 nm) en in het begin van het golflengtegebied van het groene licht (514 nm). Toepassing van deze golflengtegebieden zou niet alleen kunnen leiden tot de noodzakelijke 100% volledige schimmeldood in alle gevallen maar ook de hiervoor benodigde Sylsens B concentratie kunnen verlagen. Gebruik van groen licht heeft als additioneel voordeel dat het in staat is om door de nagel heen te gaan, net als het geval is voor rood licht. Dit is uitermate belangrijk voor het toekomstig onderzoek waarbij we gebruik willen maken van nieuw ontwikkelde multifunctionele porfyryne fotosensibilisatoren, structuurverwant aan Sylsens B. Dit onderzoek moet zich gaan richten op PDT van een schimmelinfecties van huid, haren en nagels veroorzaakt door *T. rubrum* en andere dermatofyten.

— regel 1  
 — regel 2  
 — regel 3  
 — regel 4  
 — regel 5  
 — regel 6  
 — regel 7  
 — regel 8  
 — regel 9  
 — regel 10  
 — regel 11  
 — regel 12  
 — regel 13  
 — regel 14  
 — regel 15  
 — regel 16  
 — regel 17  
 — regel 18  
 — regel 19  
 — regel 20  
 — regel 21  
 — regel 22  
 — regel 23  
 — regel 24  
 — regel 25  
 — regel 26  
 — regel 27  
 — regel 28  
 — regel 29  
 — regel 30  
 — regel 31  
 — regel 32  
 — regel 33  
 — regel 34  
 — regel 35  
 — regel 36  
 — regel 37  
 — regel 38  
 — regel 39

- regel 1 \_\_\_\_\_
- regel 2 \_\_\_\_\_
- regel 3 \_\_\_\_\_
- regel 4 \_\_\_\_\_
- regel 5 \_\_\_\_\_
- regel 6 \_\_\_\_\_
- regel 7 \_\_\_\_\_
- regel 8 \_\_\_\_\_
- regel 9 \_\_\_\_\_
- regel 10 \_\_\_\_\_
- regel 11 \_\_\_\_\_
- regel 12 \_\_\_\_\_
- regel 13 \_\_\_\_\_
- regel 14 \_\_\_\_\_
- regel 15 \_\_\_\_\_
- regel 16 \_\_\_\_\_
- regel 17 \_\_\_\_\_
- regel 18 \_\_\_\_\_
- regel 19 \_\_\_\_\_
- regel 20 \_\_\_\_\_
- regel 21 \_\_\_\_\_
- regel 22 \_\_\_\_\_
- regel 23 \_\_\_\_\_
- regel 24 \_\_\_\_\_
- regel 25 \_\_\_\_\_
- regel 26 \_\_\_\_\_
- regel 27 \_\_\_\_\_
- regel 28 \_\_\_\_\_
- regel 29 \_\_\_\_\_
- regel 30 \_\_\_\_\_
- regel 31 \_\_\_\_\_
- regel 32 \_\_\_\_\_
- regel 33 \_\_\_\_\_
- regel 34 \_\_\_\_\_
- regel 35 \_\_\_\_\_
- regel 36 \_\_\_\_\_
- regel 37 \_\_\_\_\_
- regel 38 \_\_\_\_\_
- regel 39 \_\_\_\_\_