

**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI**



Disertační práce

Olomouc 2021

Mgr. Zuzana Malá

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Ústav lékařské biofyziky

**Nanomateriály a studium účinnosti
fotodynamické reakce na
bakteriálních kmenech**

Mgr. Zuzana Malá

Školitel: Prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biofyziky, LF UP

Olomouc 2021

Prohlašuji, že jsem svoji disertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof.
RNDr. Hany Kolářové, CSc. a uvedla jsem všechny použité zdroje literatury.

Olomouc 2021

Mgr. Zuzana Malá

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce, prof. RNDr. Haně Kolářové, CSc. za odborné vedení disertační práce, za cenné rady, připomínky a veškerou pomoc během studia, hlavně za poskytnutí zázemí pro experimentální i teoretickou práci.

Dále děkuji celému kolektivu Ústavu mikrobiologie za poskytnuté informace a příjemné podmínky k práci. Především MUDr. Kateřině Bogdanové, Ph.D. a Mgr. Renatě Večeřové, Ph.D. za kultivaci bakteriálních kmenů.

Děkuji i zaměstnancům Ústavu lékařské biofyziky za cenné rady a pomoc při praktické části disertační práce.

Tato práce vznikla za podpory grantových projektů: Czech-BioImaging large RI project (LM2015062 funded by MEYS CR), European Regional Development Fund—Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868) a vnitřních grantů – Studium buněčné signalizace ve vztahu k nemoci III, IV, V, VI; IGA_LF_2016_013, IGA_LF_2017_021, IGA_LF_2018_001, IGA_LF_2019_004.

Obsah

Seznam zkratk a pojmů.....	9
Souhrn	11
Summary	13
1. Úvod.....	15
2. Fotodynamická terapie (PDT).....	15
2.1. Princip PDT	15
2.1.1. Reakce typu I.....	16
2.1.2. Reakce typu II.....	16
3. Antimikrobiální fotodynamická inaktivace (aPDI).....	16
3.1. Princip aPDI	17
4. Mechanismus destrukce tumoru	18
4.1. Fotodynamická terapie nádorů	18
4.1.1. Přímá cytotoxicita.....	18
4.1.2. Poškození cévního systému nádoru	19
4.1.3. Imunitní odpověď	19
5. Buněčná smrt.....	20
5.1. Nekróza.....	20
5.2. Apoptóza.....	20
5.3. Autofagie	21
6. Fotosensitizéry.....	21
6.1. Vlastnosti ideálního fotosensitizéru.....	22
6.2. Klasifikace fotosensitizérů	23
6.2.1. I. generace fotosensitizérů	23
6.2.2. II. generace fotosensitizérů	23
6.2.3. III. generace fotosensitizérů	24

7. Nanočástice a jejich biomedicínské aplikace	25
7.1. Nanočástice stříbra (AgNPs)	25
7.2. Polystyrenové nanočástice	26
7.3. Polymerní nanočástice PLGA	26
8. Zdroje záření pro fotodynamickou terapii	26
8.1. Lasery	27
8.2. Lampy	28
8.3. Další zdroje	29
8.4. Způsoby aplikace světla při PDT	29
9. Bakterie	31
9.1. Bakteriální buňka	31
9.2. Struktura bakteriální buňky	31
9.3. Segmenty bakteriální buňky	32
9.4. Gram-pozitivní bakteriální kmeny	35
9.4.1. Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	35
9.4.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	36
9.5. Gram-negativní bakteriální kmeny	37
9.5.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> produkující širokospektré β -laktamázy	37
9.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
10. Moderní mikroskopické metody	39
10.1. Mikroskopie atomárních sil (AFM)	39
10.2. Princip AFM	40
10.3. Zobrazovací režimy AFM	40
10.3.1. Kontaktní mód	41
10.3.2. Nekontaktní mód	41
10.3.3. Poklepový mód	42

11. Cíle práce.....	42
12. Experimentální část	43
12.1. Materiál a metody	43
12.1.1. Bakteriální kmeny.....	43
12.1.2. Porfyrinový fotosensitizer TMPyP a nanočástice stříbra AgNPs.....	43
12.1.3. Polystyrenové nanočástice s navázaným hydrofobním fotosensitizerem TPP (TPP-NPs).....	44
12.1.4. Polymerní nanočástice PLGA s navázaným kurkumínem (CUR)	45
12.1.5. Zdroje záření.....	45
12.1.6. Synergický efekt kombinace fotosensitizeru a nanočástic stříbra na bakteriálních kmenech	46
12.1.7. Stanovení synergického účinku fotosensitizeru a nanočástic stříbra....	47
12.1.8. Antimikrobiální fotodynamická terapie aplikovaná na bakteriální kmeny (TPP-NPs).....	48
12.1.9. Mikroskopická detekce buněčné smrti – AFM.....	49
12.1.10. Statistika	49
12.1.11. Kurkumín a jeho využití v antimikrobiální fotodynamické inaktivaci	50
13. Výsledky.....	50
13.1. Synergický efekt TMPyP a AgNPs	50
13.2. Fotodynamický efekt TPP-NPs vůči bakteriálním kmenům meticilin rezistentní <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> produkující širokospektré β - laktamázy, <i>P. aeruginosa</i> a <i>E. faecalis</i>	56
13.3. Zobrazení TPP-NPs pomocí AFM	60
13.3.1. AFM snímky fotodynamicky ošetřených Gram-pozitivních bakteriálních kmenů (MRSA a ENTf).....	61
13.3.2. AFM snímky fotodynamicky ošetřených Gram-negativních bakteriálních kmenů (ESBL-KP a PSEA)	63

13.4. Charakteristika PLGA mikročástic.....	66
13.5. Kurkumín a jeho použití v aPDI.....	66
14. Diskuze.....	69
14.1. Synergický efekt TMPyP a AgNPs	71
14.2. Fotodynamický efekt TPP-NPs vůči Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriálním kmenům, AFM vyhodnocení	73
14.3. PLGA nanočástice	77
15. Závěr.....	78
Seznam použité literatury	79
Publikační činnost autora	98

Seznam zkratek a pojmů

O₂(¹Δ_g) singletový kyslík

AgNO₃ dusičnan stříbrný

AgNPs nanočástice stříbra

aPDI antimikrobiální fotodynamická inaktivace

CT počítačová tomografie

CUR kurkumín

DLS dynamický rozptyl světla

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

EMA evropská léková agentura

ESBL *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β-laktamázy

FDA U.S. Food and Drug Administration

FIC frakční inhibiční koncentrace

H₂SO₄ kyselina sírová

HM Müller-Hinton

HpD hematoporfyrinový derivát

LED světlo emitující diody

MIC minimální inhibiční koncentrace

MR magnetická rezonance

MRSA meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

NPe6 mono-L-aspartyl chlorin e6

NPs nanočástice

PBS fosfátový pufr

PDT fotodynamická terapie

PLGA poly(laktid-ko-glykolid)

PLGA_CUR PLGA mikročástice s navázaným kurkumínem

PS fotosenzitizer

PVA polyvinyl alkohol

ROS reaktivní formy kyslíku

SD směrodatná odchylka

THF tetrahydrofuran

TLC tenkovrstvá chromatografie

TMPyP 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium) porphyrin tetra(p-toluenesulfonát)

TPP 5,10,15,20-Tetraphenylporphyrin

TPP-NPs nanočástice s enkapsulovaným TPP

UZV ultrazvuk

Souhrn

Disertační práce je zaměřená na studium účinků fotodynamické terapie, především však na její aplikaci v oblasti mikrobiologie v podmínkách *in vitro*. Fotodynamická terapie (PDT) je vyvíjející se diagnostická a léčebná metoda, vyžívaná především pro léčbu některých maligních i nemaligních onemocnění, ale nachází i uplatnění v terapii nenádorových onemocnění (př. v mikrobiologii při inaktivaci bakteriálních kmenů). V současnosti se léčba antibiotiky stává méně účinnou, a to především kvůli vzrůstající rezistenci bakterií k antibiotikům. Princip fotodynamické terapie je založen na aplikaci fotosensitizeru a jeho následné aktivaci viditelným zářením a vhodné vlnové délce, což má za následek produkci kyslíkových radikálů, díky kterým dochází k poškození a destrukci buňky.

V disertační práci jsou shrnuty výsledky *in vitro* studia antimikrobiální fotodynamické inaktivace (aPDI) na Gram-pozitivních (*Stafylococcus aureus* (MRSA) a *Enterococcus faecalis* (ENTF)) a Gram-negativních (*Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP) produkující širokospektré β -laktamázy a *Pseudomonas aeruginosa* (PSEA) bakteriálních kmenech. Byla ověřena účinnost aPDI s použitím různých fotosensitizerů: komerčně dostupného fotosensitizeru TMPyP, nově vyvinuté fotodynamicky aktivní látky, která byla získána navázáním TPP na polystyrenové nanočástice (TPP-NPs) a kurkumínu navázaného na polymerní mikročástice PLGA. Účinnost TMPyP byla také ověřována v kombinaci s nanočásticemi stříbra a byl studován jejich synergický efekt.

Výsledky aPDI za použití TMPyP v kombinaci s AgNPs ukázaly synergický efekt jejich působení na MRSA a ESBL-KP při použití viditelného záření s vlnovou délkou 414 nm a hustotou energie 10 J/cm². Nanočástice stříbra viditelně zvyšují účinek samotné antimikrobiální fotodynamické inaktivace s TMPyP. Velká část disertační práce je věnována ověření antimikrobiálních vlastností TPP-NPs na výše uvedených bakteriálních kmenech. Byla prokázána vyšší inaktivace u Gram-pozitivních bakterií než u Gram-negativních bakterií při koncentraci 1,5 x 10¹² TPP-NPs/ml. Pozorovali jsme účinnou inhibici na *S. aureus* a *E. faecalis* při 1,5x10¹² TPP-NPs/ml a 0,714 J/cm², zatímco pro inhibici růstu *P. aeruginosa* bylo nutno zvýšit intenzitu ozáření na 7,14 J/cm². Naše studie ukázala, že TPP-NPs mohou poškodit pouze citlivé Gram-negativní bakteriální kmeny, tedy PSEA. U multirezistentního kmene *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -

laktamázy jsme nepozorovali žádné antimikrobiální účinky. Pomocí mikroskopie atomárních sil byly detekovány výrazné rozdíly v topografiích Gram-negativních a Gram-positivních bakterií. Byly pozorovány odlišnosti v morfologických změnách Gram-positivních a Gram-negativních bakterií. Po ošetření vykazovaly všechny testované buňky zmenšení své velikosti. Jejich povrchy byly zvrásněné, membrány narušené a obsah buněk byl vylitý do okolí. Gram-negativní bakterie vykazovaly na svých površích nepravidelné výstupky podobné bublinám.

V disertační práci jsou také uvedeny výsledky pilotní studie kurkumínu navázaného na PLGA mikročástice. Účinnost těchto mikročástic pro aPDI aplikaci byla ověřena na Gram-positivním *S. aureus* při 1 minutě ozáření. Citlivost *S. aureus* na aPDI zprostředkovaná mikročásticemi PLGA-CUR byla hodnocena vyočkováním ošetřených bakterií na agarové plotny a následným odečítáním počtu narostlých kolonií. Senzibilizace *S. aureus* mikročásticemi, po které následovalo ozáření světlem po dobu 1 minuty, vedlo k usmrcení bakterií. Minimální koncentrace PLGA-CUR mikročástic pro úspěšnou aPDI *S. aureus* byla v této studii 0,005%, respektive 1,4 μM kurkumínu.

Na základě uvedených výsledků je vidět, že aPDI se jeví jako vhodná alternativa k běžné používané antibiotické léčbě. Vždy záleží na konkrétní aplikaci, daném bakteriálním kmenu, koncentraci použitého fotosensitizeru a použité plošné hustotě světelné energie.

Summary

The dissertation is focused on the study of the effects of photodynamic therapy, but especially on its application in the in vitro microbiology field. Photodynamic therapy (PDT) is an evolving diagnostic and therapeutic method, used primarily for the treatment of some malignant and non-malignant diseases, but also finds application in the therapy of non-cancerous diseases (eg. in microbiology in the inactivation of bacterial strains). At present, antibiotic treatment is becoming less effective, mainly due to the growing resistance of bacteria to antibiotics. The principle of photodynamic therapy is based on the application of a photosensitizer and its subsequent activation with visible light and a suitable wavelength, which results in the production of oxygen radicals, which damage and destroy the cell.

In my dissertation I studied antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI) on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. The efficacy of aPDI was verified using three different samples: the commercially available photosensitizer TMPyP in combination with silver nanoparticles, the newly developed photosensitizer TPP bound to polystyrene nanoparticles (TPP-NPs) and curcumin bound to polymeric PLGA microparticles. The dissertation analyzed the effect of aPDI using the above samples on the inactivation of four bacterial strains - two Gram-positive methicillin-resistant *Stafylococcus aureus* (MRSA) and *Enterococcus faecalis* (ENTF) and two Gram-negative *Klebsiella pneumoniae* bacteria (ESBL-KP) producing broad-spectrum of β -lactamases and *Pseudomonas aeruginosa* (PSEA).

The results of aPDI using TMPyP in combination with AgNPs showed a synergistic effect of their action on MRSA and ESBL-KP at 10 J/cm². Silver nanoparticles visibly increase the effect of antimicrobial photodynamic inactivation with TMPyP alone.

A large part of the dissertation is devoted to the verification of antimicrobial properties of TPP-NPs on the above bacterial strains. The obtained results were evaluated by the colony counting method (CFU), and bacterial colonies were further imaged by atomic force microscopy (AFM). Higher inactivation was demonstrated in Gram-positive bacteria than in Gram-negative bacteria at a concentration of 1,5 x 10¹² TPP-NPs/ml. We observed effective inhibition on *S. aureus* and *E. faecalis* at 1,5 x 10¹² TPP-NPs/ml and

0,714 J/cm², while to increase the growth of *P. aeruginosa* it was necessary to increase the irradiation intensity to 7,14 J/cm². Our study showed that TPP-NPs can only damage sensitive Gram-negative bacterial strains, PSEA. We did not observe any antimicrobial effects in the multidrug-resistant strain of *K. pneumoniae* producing broad-spectrum β -lactamases.

Significant differences in the topographies of Gram-negative and Gram-positive bacteria were detected by atomic force microscopy. After application of aPDI, a decrease in the height profile of individual cells was observed. Furthermore, differences in morphological changes of Gram-positive and Gram-negative bacteria were observed. After treatment, all cells tested showed a reduction in size. Their surfaces were wrinkled, the membranes were damaged, and the contents of the cells were spilled into the surroundings. Gram-negative bacteria showed irregular bubble-like protrusions on their surfaces.

The dissertation also presents the results of a pilot study of curcumin bound to PLGA microparticles. The efficacy of these microparticles for aPDI administration was verified on a Gram-positive *S. aureus* at 1 minute of irradiation. This pilot study was carried out during a six-month internship at the University degli Studi di Milano. The susceptibility of *S. aureus* to aPDI mediated by PLGA-CUR microparticles was assessed by inoculating the treated bacteria onto agar plates and then subtracting the number of grown colonies. Sensitization of *S. aureus* with microparticles, followed by irradiation with visible light for 1 minute, resulted in the killing of bacteria. The minimum concentration of PLGA-CUR microparticles for successful *S. aureus* aPDI in this study was 0,005% and 1,4 μ M curcumin, respectively.

Based on the above results, it can be seen that aPDI appears to be a suitable alternative to the commonly used antibiotic treatment. It always depends on the specific application, the given bacterial strain, the concentration of the photosensitizer used and the area density of light energy used.

1. Úvod

Rezistence bakterií je s současné době velkým celosvětovým problémem. Proto je velice důležité neustále vyvíjet nové přístupy inaktivace bakteriálních kmenů. Jako jedna z možností se ukazuje využití fotodynamické reakce.

2. Fotodynamická terapie (PDT)

Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda s nízkou invazivitou využívaná nejen k léčbě nádorových onemocnění, ale i v kosmetice. Dále nachází uplatnění i v oblasti mikrobiologie (Hamblin, 2016), kde je možnou alternativou k léčbě infekcí antibiotiky, především u rezistentích bakteriálních kmenů.

2.1. Princip PDT

K navození fotodynamické reakce jsou nutné tři nezbytné komponenty: fotosensitizer (PS), světlo a kyslík. Samostatně ani jeden z těchto komponentů nemá toxický účinek. Jedině při jejich vzájemné interakci následně dochází k fotochemické reakci indikující vznik reaktivních forem kyslíku (ROS), které vyvolají toxicitu vedoucí k buněčné smrti cestou apoptózy či nekrózy (Agostinis *et al.*, 2011).

PDT je dvoufázový proces. Nejprve se fotosensitizer akumuluje v cílové poškozené tkáni, následně dojde ke světelné expozici o vhodné vlnové délce, která fotosensitizer aktivuje. Takto aktivovaný fotosensitizer excituje ze základního stavu (S_0) do singletového stavu (S_1). Následně excitovaný fotosensitizer přechází zpět do základního stavu, a tento děj je doprovázený fluorescencí, nebo může dojít k mezisystémové konverzi, kdy PS přechází do dlouhodobějšího tripletního excitovaného stavu (T_1). Přenos energie excitovaného PS může probíhat dvěma typy reakcí – typ I a typ II. Oba typy fotochemické reakce mohou nastat současně a poměr mezi nimi závisí na použitém fotosensitizeru, jeho koncentraci a množství kyslíku (Castano *et al.*, 2004; Agostinis *et al.*, 2011). Vzniklé cytotoxické částice mohou způsobit oxidaci biologických molekul následovanou buněčnou smrtí (Cahan *et al.*, 2010).

2.1.1. Reakce typu I

Fotosensitizer nacházející se v základním neexcitovaném stavu (S_0) může absorbovat viditelné záření a přesunout se do elektronicky excitovaného singletového stavu (S_1). Poté prostřednictvím mezisystémového přechodu přeskočí do tripletního excitovaného stavu (T_1). Energie excitovaného PS může být rozptýlena buď tepelným rozpadem doprovázeným fluorescencí (přechod z S_1), nebo fosforescencí (přechod z T_1). Stav excitovaných tripletů může také přenášet atom vodíku nebo elektron na biomolekuly (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny, atd.) nebo generovat radikály, které interagují s O_2 za vzniku ROS, jako je superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) a peroxid vodíku H_2O_2 (Juarranz *et al.*, 2008).

Během reakce typu I reaguje excitovaný fotosensitizer s buněčným substrátem a dojde k vytvoření hydrogenované formy fotosensitizeru a volných radikálů. Hydratovaný fotosensitizer může být poté oxidován molekulovým kyslíkem do počáteční struktury. Radikály mohou v přítomnosti kyslíku oxidovat další substráty nebo vázat kyslík a tím tvořit peroxidy, superoxidové ionty a hydroxylové radikály, které iniciují volné radikály řetězových reakcí (Kudinova *et Berezov*, 2010).

2.1.2. Reakce typu II

Reakce typu II plně závisí na kyslíku (Cahan *et al.*, 2010). Během reakce dochází k přenosu energie z PS v tripletním stavu (T_1) přímo na molekulární kyslík v základním stavu v jeho přirozeném tripletu (3O_2), což vede k vytvoření vysoce reaktivního singletového kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$. Singletový kyslík oxiduje plazmatickou membránu, lipidy, zbytky aminokyselin proteinů a další molekuly.

Přesné mechanismy PDT zatím nejsou plně popsány, ale je všeobecně přijímáno, že $O_2(^1\Delta_g)$ produkovaný reakcí II typu je primárně zodpovědný za buněčnou smrt. Příspěvek reakcí I a II typu k buněčné smrti závisí hned na několika faktorech, včetně použitého PS, subcelulární lokalizaci, substrátu a přítomnosti O_2 (Juarranz *et al.*, 2008).

3. Antimikrobiální fotodynamická inaktivace (aPDI)

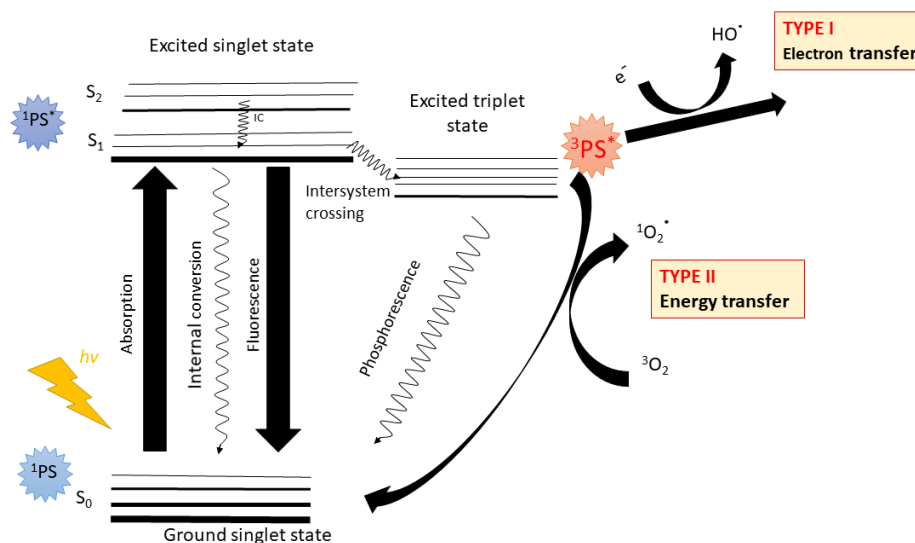
Princip antimikrobiální fotodynamické terapie byl náhodně objeven v roce 1990 studentem medicíny, Oscarem Raabem, který se zabýval studiem toxicity akridinové

červeně na *Paramecium* spp. (Raab *et al.*, 1990). Později von Tappeiner aplikoval tento přístup pro léčbu kožních karcinomů (Jesionek *et Tappeiner*, 1905) a zavedl pojem „fotodynamický jev“ (Tappeiner, 1909). Zatímco nádorová fotodynamická terapie je v klinické praxi používána více než 25 let, byly antimikrobiální aplikace fotodynamického procesu studovány na počátku 90. let, a to pouze u rezistentních infekcí (Wainwright *et al.*, 2017, Cieplik *et al.*, 2018).

3.1. Princip aPDI

Mechanismus antimikrobiální fotodynamické inaktivace (aPDI) je podobný mechanismu výše popsané fotodynamické terapie. Antimikrobiální fotodynamická inaktivace je založena na kombinaci tří komponent. Netoxická molekula, nazývaná fotosensitizer (PS), se primárně lokalizuje do patogenních buněk a okolní zdravá tkáň zůstává nezasažena. Následně se PS aktivuje viditelným zářením o vhodné vlnové délce generující reaktivní formy kyslíku (ROS), které jsou vůči patogenům cytotoxické (Maisch, 2009, Vera *et al.*, 2012).

Na obr. 1 je zobrazené Jablonského schéma popisující průběh aPDI: po absorpci fotonu se PS excituje ze základního stavu. Následně PS ztrácí energii buďto fluorescencí, nebo dojde k uvolnění tepla díky vnitřní konverzi a PS se vrací do základního stavu. Případně nastane přechod do dlouhodobějšího tripletního stavu, tedy dojde k intersystémovému přechodu. Z tohoto stavu se PS může navrátit do základního stavu dvěma způsoby. Buďto pomocí fosforescence, nebo pomocí dvou typů mechanismů generující reaktivní formy kyslíku (ROS). Po proběhnutí celého cyklu se PS nachází zpět v základním stavu a může opět dojít k absorpci dalšího fotonu a následně produkci dalších ROS. Jedna molekula PS může generovat až tisíce molekul singletového kyslíku předtím než dojde k jejímu kompletnímu zničení. Poměr mezi jednotlivými mechanismy průběhu reakce je jedinečný pro každý PS a záleží na jeho chemické struktuře (Maisch *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2018; Baptista *et al.*, 2017; Wainwright *et al.*, 2017).



Obr. 1: Schéma mechanismu fotodynamické reakce typu I (přenos elektronu) a II (přenos energie). Jablonského diagram ukazující mechanismus PDI. Po absorpci světla je fotosensitizer vybuzen do excitovaného singletního stavu. Vnitřní konverzí se PS dostane do excitovaného tripletního stavu, kde může dojít ke dvěma typům reakce. První elektronový přenos, kdy dojde k reakci s biomolekulami skrz atom vodíku, a vznikají volné radikály, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku ROS. Druhý energetický typ reakce: PS v tripletním stavu může přímo reagovat s kyslíkem a vzniká singletový kyslík (Malá et al., 2021).

4. Mechanismus destrukce tumoru

4.1. Fotodynamická terapie nádorů

K destrukci tumoru během PDT dochází třemi hlavními mechanismy. Prvním z nich je přímý cytotoxický efekt volných radikálů a produktů oxidace na nádorové buňky. Druhým mechanismem je poškození cévního systému nádoru. Třetím, a posledním, je aktivace imunitní odpovědi organismu proti tumorovým buňkám.

4.1.1. Přímá cytotoxicita

Rozsah poškození tumoru a cytotoxicita závisí na typu použitého fotosensitizeru, jeho intra a extracelulární lokalizaci, podaném množství, celkové plošné hustotě světelné energie, kyslíkové dostupnosti a časovém intervalu mezi podáním léčiva a samotným

ozáření. Poločas života singletového kyslíku je v biologických systémech menší než 0,04 μ s a jeho dosah je 0,02 μ s. Proto je pro cytotoxický efekt PDT klíčová lokalizace fotosensitizeru.

Lipofilní fotosensitizery mohou pronikat do buněčného jádra a poškozovat DNA včetně plazmatické membrány, mitochondrií, lysozomů, jaderné membrány a endoplasmatického retikula. Fotoperoxidace membránového cholesterolu a nenasycených fosfolipidů vede ke změnám v propustnosti membrány, ztrátě pružnosti a nestability, zesílení amino a polypeptidů, inaktivaci enzymů a receptorů asociovaných s membránou. Inaktivace membránového transportního systému, depolarizace plazmatické membrány a inhibice enzymů opravujících DNA, může předcházet inaktivaci mitochondriálních enzymů. Což je později klíčem k buněčné smrti (Kudinova *et Berezov*, 2010; Huang *et al.*, 2008; Bisland *et al.*, 2004).

4.1.2. Poškození cévního systému nádoru

Poškození cévního systému bylo již dříve popsáno u řady fotosensitizerů včetně Photofrinu 2, purpurinů, ftalocyaninů a mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) (Soukos *et al.*, 1998). Časový interval začátku a konce cévního poškození se liší nejen podle konkrétního nádoru, ale také podle použitého fotosensitizeru. Ozáření fotosensitivní látky způsobí kolaterální poškození endoteliálních buněk, což se projeví jako ztráta těsných spojů mezi buňkami. Následně vznikají trombogenní místa a dochází k iniciaci kaskády fyziologických reakcí (agregace trombocytů, adheze leukocytů, zvýšení vaskulární permeability a konstriktce cév). Mikrovasculární kolaps, omezení průtoku krve a hemoragie mohou vést k trvalé post-PDT nádorové hypoxii a pozitivnímu efektu na léčbu nádoru (Huang *et al.*, 2008; Henderson *et Fingar*, 1987; Fingar, 1996; Abels, 2004; Huang, 2005).

4.1.3. Imunitní odpověď

Fotodynamická terapie způsobuje výrazné, krátkodobé, reverzibilní potlačení imunitního systému. Avšak na rozdíl od radioterapie a chemoterapie PDT nezpůsobuje závažné negativní účinky na hostitelském imunitním systému. Studie z počátku 90. let uváděly infiltraci lymfocytů, leukocytů a makrofágů v tkáních léčených PDT, ukazujících aktivaci imunitního systému v odpovědi k PDT. Rozdíly v intenzitě imunitní odpovědi

u normální a tumorové tkáně mohou přispívat k selektivitě PDT pro nádorovou tkáň (Kudinova *et Berezov*, 2010).

5. Buněčná smrt

Hlavním cílem fotodynamické terapie je vyvolat buněčnou smrt. Rozlišujeme tři typy buněčné smrti, apoptózu, nekrózu a autofagii. Typ buněčné smrti určuje samotný typ buňky, buněčná lokalizace fotosensitizeru a plošná hustota světelné energie. Vysoká koncentrace fotosensitizeru nebo vysoká intenzita záření, případně jejich kombinace (vysoká dávka PDT) vede k nekróze, naopak nižší dávka PDT vede k apoptóze (Buytaer *et al.*, 2007; Mroz *et al.*, 2011).

5.1. Nekróza

Nekróza je ireverzibilní neprogramované poškození, které je výsledkem dvou mechanismů, natrávení buňky enzymy z lysozomů a denaturace proteinů. Nekróza není jen patologický proces, ale je součástí fyziologických procesů, u kterých je nutné odstranit nevhodné buňky. Průběh nekrózy můžeme rozdělit do několika stádií. V rané části dochází k narušení buňky, cytoplazmatické membrány a dalších organel. V cytosolu se zvyšuje koncentrace Ca^{2+} a klesá pH. Při nekróze se zapojují i volné radikály a peroxid vodíku, které narušují DNA a lipidy (Degterev *et al.*, 2005). Mitochondrie zvětšují svůj objem a jejich obsah uniká do okolí, dojde k navození zánětlivé reakce a poškozená buňka se nakonec rozpadne (Masopust *et al.*, 2003).

5.2. Apoptóza

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je proces aktivace za normálního stavu neaktivních kaskád procesů pomocí vnitřních a vnějších faktorů. Během apoptózy dochází k morfologickým, biochemickým a energetickým změnám, které vedou k systematické a kontrolované buněčné destrukci a tvorbě apoptotických tělísek s buněčnými organelami, které jsou následně fagocytovány. Organismus se takto chrání před nadbytečnými, poškozenými či zmutovanými buňkami. Apoptóza se projevuje smrštěním buňky, kondenzací chromatinu v jádře, fragmentace a zmenšení jádra. Tento proces končí segregací buňky do apoptotických tělísek, která jsou pohlcena

fagocytujícími buňkami (Plaetzer *et al.*, 2003; Byutaert *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2009).

5.3. Autofagie

Autofagie je buněčný program, který zodpovídá za recyklaci buněčných komponent během hladovění či pro odstranění poškozených organel a podporu přežití buňky. Jedná se o katabolický mechanismus umožňující buňce udržet rovnováhu mezi syntézou, degradací a recyklací buněčných produktů. Při rozsáhlém poškození lze autofagie považovat za další typ buněčné smrti. Všechny autofagní procesy zahrnují lysozomální degradaci buněčných organel a proteinů. Zatím není jasné, jak konkrétně se autofagie podílí na procesu PDT, ale savčí buňky autofagii využívají jako obranu proti ROS (Mroz *et al.*, 2011; Kessel *et al.*, 2006; Reiners *et al.*, 2010; Scherz-Shouval *et al.*, 2007; Sasnauskiene *et al.*, 2009; Kessel *et al.*, 2009).

6. Fotosensitizéry

Fotosensitizéry jsou jednou z hlavních a podstatných komponent fotodynamické terapie. Jsou to látky schopné absorbovat světlo o specifické vlnové délce a přeměnit jej na energii užitečnou ve fotochemické reakci II. typu. Koncové produkty této chemické reakce způsobují toxicitu. Každý fotosensitizér musí splňovat určitá kritéria, jedním z nich je schopnost preferenční akumulace v cílové tkáni následovaná produkcí cytotoxických produktů a indukci požadovaných biologických odezev (Zimčík *et al.*, 2004).

Hematoporfyrinový derivát (HpD) byl jedním z prvních testovaných fotosensitizérů a jeho purifikované verze Photofrin® patří k prvnímu klinicky schválenému fotosensitizéru. Bohužel u této první generace fotosensitizérů se vyskytovala celá řada vedlejších účinků. Hlavním problémem byla dlouhotrvající kožní senzitivita a fototoxicita u pacientů, kdy Photofrin® přetrvával v kůži až 6 týdnů po aplikaci (Zimčík *et al.*, 2004). Na základě těchto skutečností byla vyvinuta druhá generace fotosensitivních látek, která měla tuto překážku eliminovat a vylepšit vlastnosti PS. Do druhé generace patří např. ftalocyaniny, chloriny a bakteriochloriny, které vykazují vyšší schopnost zadržení v tumorové tkáni a absorpci při vyšších vlnových délkách. Některé

z těchto látek, např. Levulan®, Visudin®, Radachlorin® a Foscan®, byly schváleny a aplikovány pro léčebné účely jak rakovinných tak i nerakovinných onemocnění (Qiang *et al.*, 2006).

6.1. Vlastnosti ideálního fotosensitizeru

Během vývoje těchto fotosensitivních látek byly stanoveny vlastnosti ideálního fotosensitizeru, které pomohou ve vývoji nových a lepších fotosensitizerů. Současně vyvíjené látky mají snahu se k ideálu co nejvíce přiblížit, ale dosud nebyla zatím nalezena látka, která by splňovala všechna kritéria. Nejdůležitější kritéria ideálního fotosensitizeru (Zimčík *et Miletín*, 2004; Ethirajan *et al.*, 2008; Allison *et al.*, 2004, Lang *et al.*, 2006):

- Chemická čistota – PS by měl mít jasnou chemickou kompozici a složení. Mělo by se jednat o chemicky čistou látku.
- Toxicita – PS by měl mít minimální „temnou“ toxicitu (toxicita bez přístupu světla).
- Farmakokinetika – PS by měl mít vhodné farmakokinetické vlastnosti – absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece. Eliminace z těla by měla být co nejrychlejší (řádově dny), aby se zabránilo dlouhodobé fotosensitizaci kůže.
- Spektrální vlastnosti – přednostně by měl PS absorbovat světlo v oblasti vyšších vlnových délek.
- Kvantový výtěžek $O_2(^1\Delta_g)$ – PS by měl mít vysoký kvantový výtěžek tripletního stavu a dlouhou dobu života tohoto stavu, což umožňuje vysokou produkci singletového kyslíku a dalších ROS.
- Selektivita – PS by měl vykazovat zvýšenou kumulaci v cílové tkáni.
- Polarita – rozdílná aplikace hydrofobních a hydrofilních látek. Velkou výhodou je, pokud je PS amfifilní, usnadňuje průchod přes membránu.
- Mutagenita – PS by neměl prokazovat mutagenní a karcinogenní účinky.
- Cena a dostupnost – PS by neměl být příliš drahý a dále by měl být snadno komerčně dostupný nebo připravitelný v lokální laboratoři.

6.2. Klasifikace fotosensitizerů

Fotosensitizery lze klasifikovat podle několika způsobů – dle generace, chemické struktury, čistoty a buněčného zacílení. Nejpoužívanějším rozdělením je klasifikace podle generace fotosensitizeru, tedy dle časového vývoje.

6.2.1. I. generace fotosensitizerů

První generace PS byla vyvinuta v 70. letech a na počátku 80. let 20. století. Hematoporfyrin (HpD) jako směs produktů byl poprvé izolován z hemu v roce 1841 Schererem. Tyto sloučeniny byly rozsáhle studovány a v roce 1867 byly stanoveny jejich fluorescenční vlastnosti. Studie potvrdily možnost použití těchto fotosensitizerů ve fotodynamické terapii pro léčbu rakoviny. Vylepšením vlastností a purifikací HpD vznikly komerční produkty např. Protocan, Photosan a Photofrin®. Jednou z hlavních nevýhod těchto fotosensitizerů byla nutnost vysoké použité koncentrace, a to z důvodu jejich nízké selektivity nádorové tkáni. Pouze 3% injektovaného množství PS selektivně napadá nádorovou tkáň (Dumoulin, 2012).

Photofrin®, pročištěný HpD, s absorpčním maximem 630 nm byl prvním schváleným fotosensitizerem (Kanada, 1993) pro léčbu rakoviny močového měchýře (Dougherty *et al.*, 1998; Huang, 2006). V USA je tento PS schválen úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA - U. S. Food and Drug Administration) pro léčbu Barrettova jícnu, ezofageálních obstrukčních lézí a endobronchiálních lézí.

6.2.2. II. generace fotosensitizerů

Na základě nedostatků první generace byly vyvinuty fotosensitizery druhé generace. Látky druhé generace jsou již chemicky čistší, lépe charakterizovatelné, absorbují světlo delších vlnových délek a mají nižší sensitivitu kůže vůči světlu. Do druhé generace spadají látky ze skupiny porfyrinů, ftalocyaninů, chlorinů, bakteriochlorinů a další.

5 – aminolevulinová kyselina (ALA) (Levulan®, Hexvix®, Benzvix® a Metvix®)

Tento fotosensitizer II. generace má absorpční maximum 410 nm a další čtyři píky v blízkosti vlnových délek 510, 540, 580 a 635 nm, což umožňuje použití různých zdrojů záření. ALA se v organismech enzymaticky přeměňuje na účinný fotosensitizer

protoporfyrin IX, který se dále mění na hem. Levulan vyráběný firmou DUSA Pharmaceuticals byl schválen již v roce 1999 Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro léčbu aktinické keratózy v oblasti obličeje a temene hlavy. Od roku 2001 byl pro léčbu aktinické keratózy povolen i metyl ester kyseliny 5 -aminolevulinové (Metvix®), který se nyní využívá i pro léčbu karcinomu bazálních buněk kůže. Jeho výhodou je především lepší průnik do pokožky, a to díky jeho vyšší lipoficitě. Benzvix® tedy benzyl ester kyseliny 5 – aminolevulinové je fotosensitizer využíváný pro léčbu gastrointestinálního traktu (Ormond *et Freeman*, 2013; Castano *et al.*, 2008, O'Connor *et al.*, 2009).

Ftalocyaniny

Ftalocyaniny jsou látky chemicky podobné porfyrinům. Mají optimální fotochemické a fotofyzikální parametry a díky tomu jsou často využívány ve fotodynamické terapii. Absorpční maximum leží v oblasti infračerveného záření (630–690 nm). Jejich výhodou je vysoká produkce ROS s dlouhotrvajícím tripletním stavem, což je důsledek přítomnosti centrálního kovu nebo polokovu (např. zinek, hliník, silikon), která zvyšuje účinnost PDT (O'Connor *et al.*, 2009; Wainwright, 1998).

6.2.3. III. generace fotosensitizerů

Třetí generace je tvořena fotosensitizerými druhé generace lokalizovanými na nosičích (protilátky, liposomy, polymery a nanomateriály), které jsou zodpovědné za cílenější distribuci v nádorové tkáni (Lamch *et al.*, 2014; Bazylińska *et al.*, 2017; Kataoka *et al.*, 2017).

Typickou nevýhodou použití volných fotosensitizerů, které nejsou navázány na žádnou matici, je jejich tendence agregovat a tím významně snižovat životnost excitovaných stavů a následně negativně ovlivňuje fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$ a citlivost jejich tripletních stavů k jejich zhasičům (Procházková *et al.*, 2004). Vazba fotosensitizeru na nanočástice představuje všestranný a výkonný nástroj pro změnu/vyladění vlastností zapouzdřených nebo připojených molekul (Salomoni *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008).

7. Nanočástice a jejich biomedicínské aplikace

Za nanostruktury můžeme považovat materiály, jejichž alespoň jeden z rozměrů je menší než 100 nm (Laurent *et al.*, 2010). Nanomateriály, které mají všechny své rozměry menší než 100 nm, nazýváme nanočástice (Grillo *et al.*, 2015; Nováková *et al.*, 2009). Zatím ovšem neexistuje jednotná definice nanomateriálů nebo nanočástic (Dohnalová *et al.*, 2015). Nanomateriály se od materiálů s rozměry nad 1 μm liší strukturou nejen na atomární úrovni, ale i z hlediska makroskopického. Nanočástice různých velikostí, tvarů a materiálů s různou povrchovou úpravou mají řadu technologických a biomedicínských aplikací (Loos *et al.*, 2014).

Nanočástice (NPs) můžeme rozdělit do několika kategorií, a to podle jejich morfologie, tvaru, fyzikálních a chemických vlastností. Níže jsou uvedeny tři dobře známé skupiny nanočástic rozdělených podle fyzikálně chemických vlastností.

7.1. Nanočástice stříbra (AgNPs)

Stříbro bylo využíváno již ve starověku, a to díky svým antimikrobiálním vlastnostem. Jako prevence proti různým nemocem se používaly stříbrné přístroje, pro uchování potravin se používaly nádoby ze stříbra. Šlechticům se v 15. století začalo stříbro přidávat i do jídla, což vedlo k modro-šedému zabarvení kůže. S objevem antibiotik bylo využívání stříbra omezeno (Prabhu *et al.*, 2012), v druhé polovině 20. století s rozvojem nanotechnologií se zájem o studium koloidů stříbra opět zvýšil a v současnosti stále roste (Kvítek, 2006). Znovu se začíná využívat jak v průmyslovém, tak v medicínském odvětví (Večeřová, 2016).

Stříbrné nanočástice (AgNPs) se dnes celkem běžně používají v mnoha oborech, jsou součástí hraček, matrací, obuvi, textilií, zubních past, čisticích prostředků, obalů potravin i nátěrů ledniček. AgNPs se často používají v lékařské praxi, např. k lokálnímu ošetření ran a popálenin (obvazy, náplasti), úprava lékařských nástrojů, katetrů, dentálních pomůcek (Cleveland *et al.*, 2012; Marambio-Jones *et al.*, 2010; Prabhu *et al.*, 2012; Tománková *et al.*, 2015; Večeřová, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

7.2. Polystyrenové nanočástice

Polystyren v buňce nedegraduje prostředí a nevykazuje žádnou krátkodobou cytotoxicitu, a proto se jeví jako vhodný pro přípravu nanočástic. Samotná syntéza je snadná a umožňuje získat nanočástice různých rozměrů (Venier-Julienne *et al.*, 1995). Polystyrenové nanočástice jsou vhodné pro aplikaci v různých odvětvích, například jako plniva v polymerních nanokompozitech či jako polymerní filtry pro dielektrické využití (Holley *et al.*, 2014). Další možnou aplikaci je jejich využití v biomedicínské oblasti, např. jako nosiče léčiv.

Jednou z možností přípravy polystyrenových nanočástic je sulfonace nanovláknenných membrán. Výhodami takto připravených nanočástic je jejich malá velikost, velký poměr velikosti povrchu k objemu, vysoká koncentrace vazebných míst a jejich snadné odstranění z vodného prostředí filtrací přes nanovláknennou membránu, ze které byly připraveny.

7.3. Polymerní nanočástice PLGA

Nanočástice na organické bázi se v literatuře označují jako polymerní nanočástice, většinou se jedná o nanosféry (Mansha *et al.*, 2017). Polymerní nanočástice jsou snadno funkcionalizovány, a proto najdou široké uplatnění v různých aplikacích často jako nosiče léčiv.

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) je jedním z nejúspěšnějších biologicky rozložitelných polymerů, a proto se často používá jako materiál pro syntézu nanočástic. Díky svým atraktivním vlastnostem, biodegradabilitě a biokompabilitě, je mu věnována velká pozornost. Tento polymer byl schválen úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA) k používání v řadě terapeutických aplikacích (Danhier *et al.*, 2012).

8. Zdroje záření pro fotodynamickou terapii

Další nutnou komponentou fotodynamické terapie je zdroj záření o vhodné vlnové délce, který aktivuje fotosenzitizer. Konkrétní zdroj záření je zvolen podle vlastností daného fotosenzitizeru, místa lokalizace, přístupnosti, velikosti nádoru a způsobu doručení světla. Pro správný výběr je důležité rozumět absorpci a rozptylu světla

v různých tkáních. Pro aplikaci PDT je nutné předpovědět prostorové rozložení světla v cílové tkáni (Robertson *et al.*, 2009).

8.1. Lasery

Lasery jsou zdroje záření, které produkují monochromatické záření o vysoké energii s úzkým rozpětím vlnových délek (< 1 nm). Díky těmto vlastnostem je můžeme využít při aplikaci PDT pro aktivaci konkrétního fotosensitizeru. Propojení s optickým vláknem umožňuje přesné zacílení a předání potřebného záření přímo do konkrétního místa (Weersink *et Lilge*, 2008).

Argonové lasery a barvivové lasery čerpající argon

Tento typ laseru patří ke standardním zdrojům používaných v klinické aplikaci PDT (Mang, 2004). Laserová barviva mají překryv absorpčního pásu alespoň s jednou emisí linií argonu (488 a 514 nm) a emisí v oblasti excitace porfyrinu (600 a 650 nm). Výkon těchto laserů dosahuje až 4 W. Argonové lasery se především využívají v endoskopické PDT díky malému průřezu výstupního paprsku a jeho snadného propojení s optickými vlákny (Brancaleon *et Moseley*, 2002). Je možné je aplikovat při léčbě rakoviny úst, Barretova jícnu (Krishnadath *et al.*, 2000), rakoviny plic (Marijnissen *et al.*, 1993), dále rakoviny močového měchýře a malých kožních lézí (De Rosa *et Bentley*, 2000).

Barvivové lasery čerpající páry kovů

Další často využívanou skupinu laserů tvoří barvivové pulsní lasery čerpající páry kovů. Pracují na vysoké pulsní frekvenci (1 kHz), s délkou pulsu 10 – 50 ns a jejich hustota výkonu může dosahovat až stovek W/cm^2 . V kombinaci s endoskopickou PDT se používají k léčbě nádorů krku, hlavy, plic a močového měchýře. Na rozdíl od argonových laserů se mohou používat i pro ozáření rozsáhlých kožních nádorů, a to z důvodu velkého průměru paprsku až 3 cm^2 (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

Pevnolátkové lasery

Pevnolátkové lasery se využívají v obdobných diagnózách, ale od předchozích typů se liší kompaktnějším designem, který nabízí výhody jak pro laboratorní, tak i klinické použití. Pracují na vyšších frekvencích při kratší délce pulzu. Emitují v infračervené oblasti, např. Nd:YAG laser při 1064 nm využívaný pro terapii v tracheobronchiálním stromu (Shah *et Ost*, 2000).

Diodové lasery

Diodové lasery představují průlom v oblasti zdrojů pro fotodynamickou terapii. Spektrální šířka je u těchto laserů kolem 6 nm. Mají plno kladných vlastností, především kompaktnost, všestrannost, snadnou manipulovatelnost a přesnost jak pro laboratorní, tak i pro klinické použití, přičemž si zachovávají dostatečný výkon (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

8.2. Lampy

Lampy jsou zdroje širokospektrálního nekoherentního záření. Na rozdíl od laserů mají širší spektrum vlnových délek a používají se v kombinaci s různými typy filtrů, např. UV filtr, IR filtr. Velkými výhodami lamp je jejich přenositelnost, snadná použitelnost a levná udržitelnost. Nevýhodou představuje zahřívání, nízká hustota zářivé energie, obtížná kontrola ozařovacích parametrů a nemožnost propojení s optickými vlákny (Pervaiz *et* Olivo, 2006). Jsou schopné ozářit velkou plochu, a proto jsou vhodné k léčbě velkých povrchových lézí, nikoli pro endoskopickou PDT (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Halogenové lampy

Halogenové lampy jsou zdroje s žhaveným wolframovým vláknem, jehož teplota roste, až na 3000 K. Při této teplotě dochází k emisi širokého spektra vlnových délek od oblasti UV po blízkou IR. Tyto lampy mohou poskytovat intenzitu záření až 250 mW/cm². K dosažení konkrétní vlnové délky je potřeba použít filtry ve vhodné kombinaci (Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Xenonové obloukové lampy

Záření je emitováno elektrickým obloukem hořícím mezi dvěma elektrodami v přítomnosti vysokého tlaku xenonových par. Lampy jsou charakterizovány širokou spektrální emisí (300–1200 nm) a vysokým výkonem. Pro výběr konkrétní vlnové délky se opět používají filtry (Clark *et al.*, 2003, Brancaleon *et* Moseley, 2002).

Lampy kovových halogenidů

Zdrojem těchto lamp je opět elektrický oblouk hořící za přítomnosti směsi rtuťových a halogenových par. Intenzita záření je od 10 – 250 mW/cm² a plocha ozáření

může být dost velká. Tento typ lamp se především využívá jako zdroj k přímé expozici, spojení se světlometem není moc časté (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

Sodíkové lampy pokryté fosforem

Princip práce sodíkových lamp je obdobný lampám kovových halogenidů, kde je elektrický oblouk generován v přítomnosti sodíkových par. Povrch výbojky je pokryt fosforem absorbujícím sodík a emitujícím záření v různých oblastech. V praxi se nejčastěji používá k terapii kožních lézí (Brancaleon *et Moseley*, 2002).

8.3. Další zdroje

Světlo emitující diody (LED)

Světlo emitující diody patří ke zdrojům nekoherentního světla a jsou poměrně novým zdrojem záření poskytujícím výhody pro klinické i laboratorní použití. Volba vhodné emisní vlnové délky se pohybuje od oblasti UVA (350 nm) až k blízké IR (1100 nm). Limitujícím faktorem pro použití v PDT se uvádí hustota výkonu, který může být až 150 mW/cm². Velkými výhodami pro PDT jsou všestrannost, kompaktnost, modifikovatelnost, přenositelnost a v neposlední řadě cena. Navíc diody mohou být sestaveny do různých ozařovacích schémat podle anatomického místa nádoru. Díky tomu jsou vhodné pro terapii nádorů obličeje a mozku (Pervaiz *et Olivo*, 2006).

8.4. Způsoby aplikace světla při PDT

Kromě volby vlnové délky záření, která je shodná s absorpčním maximem fotosensitizeru, je nutné zohlednit i velikost a lokalizaci nádoru. Na základě těchto věcí se volí vhodná technika samotného ozáření.

Povrchová (superficiální) PDT

Povrchové ozáření se využívá u lehce dostupných nádorů na povrchu kůže nebo mukózní vrstvy, jejichž tloušťka je menší než hloubka penetrace použitého světla. Při běžné chirurgické praxi je ozářeno i blízké okolí nádoru (zdravá tkáň), tzv. bezpečnostní lem v šířce 0,5 – 1 cm (Kübler, 2005).

Intersticiální PDT

Intersticiální fotodynamická terapie je využívána u nádorů, které jsou větší než 1 cm. Optické vlákno je opatřeno difuzorem umístěným na jeho konci a zavedeno do nádorové tkáně. Zavedení laserových vláken je řízeno pomocí zobrazovacích technik jako např. magnetická rezonance (MR), počítačová tomografie (CT) nebo ultrazvuk (UZV). Pro velké nádory je možno připravit mřížku, kde jsou optická vlákna uložena ve vzdálenosti 1 - 2 cm od sebe, toto uspořádání poté umožňuje ozářit celý nádor zároveň. Proto je tato technika užívána u rozsáhlých a hluboce uložených nádorů, dále u neoperovatelných nádorů a nádorů, kde chirurgické odstranění může způsobit resekce. Intersticiální PDT je kvůli nepřesné dozimetrii nádoru využívána především při paliativní léčbě (Kübler, 2005).

Intraoperativní PDT

Při intraoperativní PDT je fotosensitizer podán pacientovi několik dní před samotnou operací v závislosti na typu fotosensitivní látky, s ohledem na rychlost její akumulace v cílové tkáni. Po uplynutí dané doby je nádor chirurgicky odstraněn a následně je provedena intraoperativní PDT. Cílem tohoto kombinovaného přístupu je odstranění těžce dostupných zbytků tumoru, a to i v anatomicky těžce dostupných místech. Nežádoucí světlo nad operačním polem je odstíněno pomocí filtrů, které eliminují vlnové délky světla aktivující použitý fotosensitizer. V současné době je tato metoda využívána v experimentálních klinických podmínkách při léčbě nádorů hlavy a krku (Kübler, 2005, Lyons *et al.*, 2012).

Intrakavitární PDT

Při této aplikaci PDT jsou využívány speciální světelné difuzory, kdy se kombinuje vyhledávač pro určení světelného aplikátoru a 3D zobrazení pro znázornění dávky světla. Tato metodika se využívá pro nádory nacházejících se uvnitř dutých orgánů, např. děloha, jícen či průdušky (Lyons *et al.*, 2012).

9. Bakterie

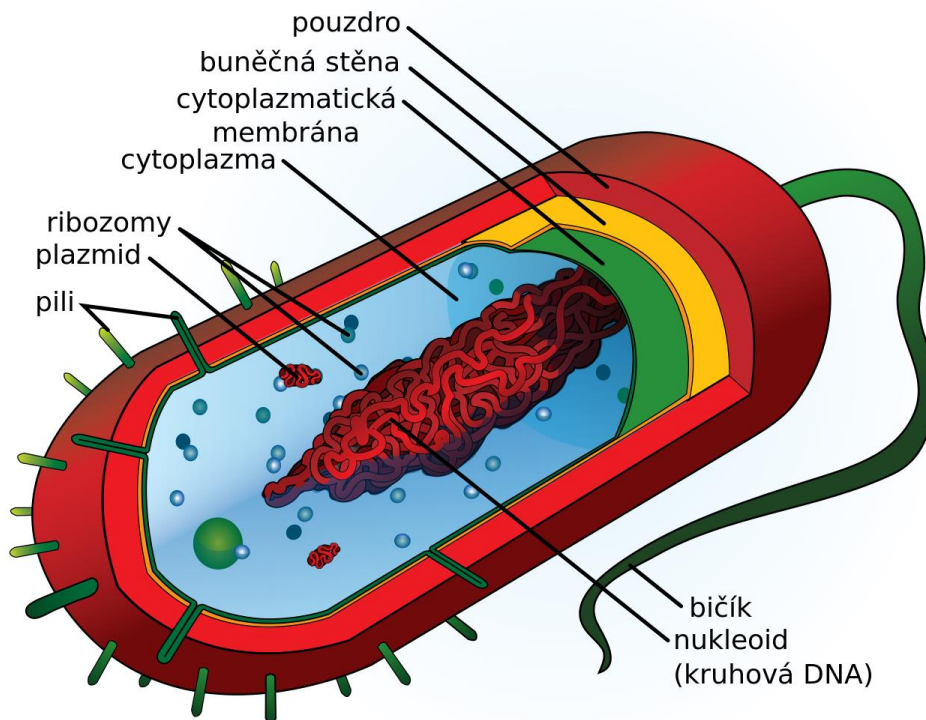
9.1. Bakteriální buňka

Bakteriální buňka je typem prokaryotické buňky a má na rozdíl od buňky eukaryotní (rostlinná a živočišná buňka) jednodušší stavbu. Bakteriální buňka je menší než buňka živočišná, její velikost se pohybuje v desetinách až desítkách mikrometrů.

9.2. Struktura bakteriální buňky

Prokaryotní buňka má pět základních strukturních složek: jádro (DNA), ribozomy, buněčnou membránu, buněčnou stěnu a povrchovou vrstvu, která může nebo nemusí být nedílnou součástí stěny.

Strukturálně existují tři architektonické oblasti: bičíky a pili (fimbrie) připojené k buněčnému povrchu polysacharidovou nebo proteinovou ochranou vrstvu a cytoplazmatickou oblast, která obsahuje buněčný chromozom (DNA) a ribozomy (obr. 2).



Obr. 2.: Bakteriální buňka a její části (<https://www.wikiskripta.eu>).

Genetická informace je uložena v nukleové kyselině, neobalená DNA se nachází volně v cytoplazmě a je tvořena jedním kruhovým chromosomem. V bakteriích se mohou ještě vyskytovat malé molekuly DNA zvané plazmidy, které obsahují přídatnou genetickou informaci (Kaprálek, 2000).

Jak DNA, tak i RNA mají v bakteriích stejnou podobu jakou v jiných typech buněk. DNA má tvar dvoušroubovice obsahující báze, deoxyribózu a kyselinu fosforečnou. RNA mají podobu jednořetězcové lineární molekuly a vyskytující se ve třech formách – mRNA, tRNA a rRNA (Čechová *et* Jamalíková, 2007).

9.3. Segmenty bakteriální buňky

Jádro a plazmidy

V jádru je uložena genetická informace buňky. Jádro bakterií je tvořeno skládanou do kruhu stočenou dvoušroubovicí DNA, která tvoří asi 15 % celkového objemu buňky a od cytoplazmy není oddělena membránou. Tuto kruhovou kovalentní konformaci můžeme za fyziologických podmínek nazývat superhelicita. V klidové fázi buňky je přítomen pouze jeden chromozom, v rostoucí fázi dochází k jeho replikaci (Kaprálek, 2000).

V bakteriální buňce se mohou vyskytovat další typy DNA, a to ve formě plazmidů, které jsou také do kruhu stočené, ale asi 100x menší. Jedná se o přídatné části genetické informace bakterie, které poskytují zvýhodnění bakterií v nepříznivých podmínkách. Plazmidy mohou kódovat 3 – 100 genů a jejich molekulová hmotnost se řádově pohybuje od 10^6 do 10^8 daltonů. V buňce se mohou vyskytovat kompatibilní a inkompatibilní plazmidy. Inkompatibilitou se rozumí neschopnost existence dvou plazmidů v jedné buňce. Inkompatibilní plazmidy využívají stejný mechanismus replikace a segregace a jsou vzájemně příbuzné a buňka může jeden z plazmidů trvale ztratit. Jelikož buňka nemá schopnost si plazmid vytvořit, jedinou možností opětovného získání plazmidů je opatřit si jej z jiného zdroje. Získání může probíhat různými prostřednictvími: konjugace – spojení dvou buněk a přenos fibriemi; transdukce – přes bakteriofág, kdy do fágové hlavičky je uzavřena plazmidová DNA na místo fágové; transformace – proniknutí volné molekuly z prostředí do bakterie (Kaprálek, 2000).

Cytoplazma

Každá bakteriální buňka je uvnitř vyplněna cytoplazmou obsahující chromozom, ribozomy a zásobní látky. V cytoplazmě dochází k jednotlivým interakcím, pohybu, vyhledávání molekul a struktur. Probíhají zde katalytické reakce metabolismu. Většina proteinů obsažených v cytoplazmě má enzymatickou funkci (Čechová *et* Jamalíková 2007, Kaprálek, 2000).

Ribozomy

Ribozomy jsou složeny ze dvou podjednotek – 30S a 50S spojených ve funkční jednotku 70S. Syntéza ribozomů v bakteriální buňce je regulovaná, aby nedocházelo k jejich hromadění. Jejich počet se přímo úměrný růstu buňky a jejich počtem je regulována rychlost proteosyntézy. Ribozomy se nacházejí volně v cytoplazmě, nasedlé po obvodu buňky, kde slouží k syntéze proteinů nebo nasedlé na mRNA v oblasti jádra, kde slouží k translaci RNA (Čechová *et* Jamalíková, 2007; Kaprálek, 2000).

Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je dvojvrstva fosfolipidů, která hydrofobními nebo elektrostatickými silami poutá molekuly proteinů. Vyskytují se zde jak strukturální, tak i funkční proteiny. Tato tlustá vrstva (7-8 nm) je asymetrická ve stavební i funkční oblasti. Neobsahuje cholesterol a podíl nasycených a nenasycených mastných kyselin se mění v závislosti na teplotě. Cytoplazmatická membrána je jediná membrána bakterií a lokalizuje všechny funkce:

Izolace vnitřního prostředí a propustnost – nepropouští polární molekuly, je tedy selektivní.

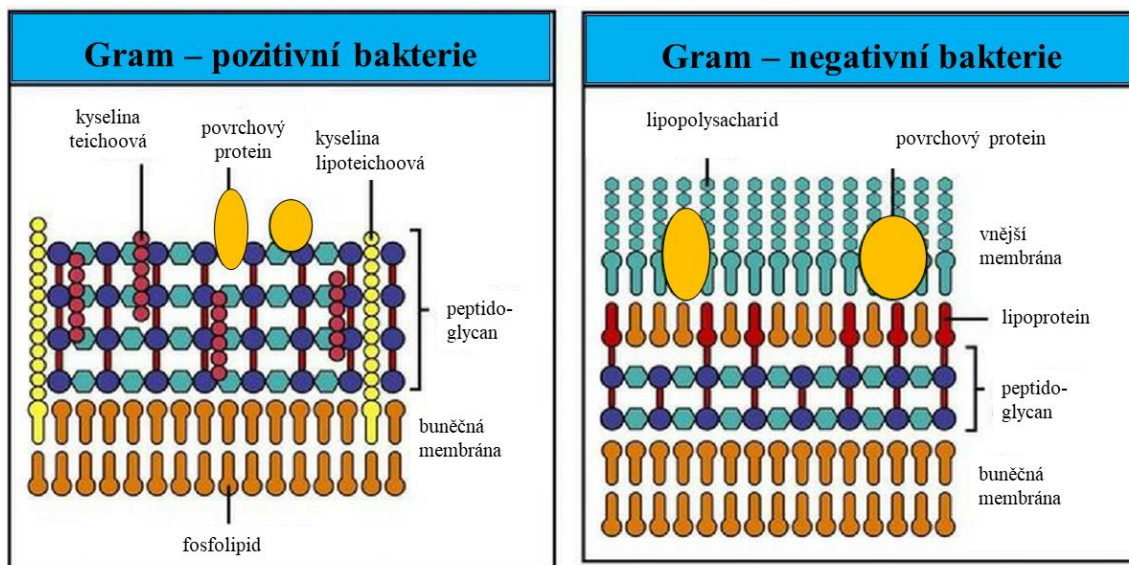
Lokalizace enzymů Krebsova cyklu, enzymů syntézy a hydrolýzy lipidů.

Lokalizace vazebných proteinů – histidin, leucin.

Transformace energie – respirační řetězec.

Buněčná stěna

Nad cytoplazmatickou membránou se nachází pevná buněčná membrána, která vytváří skelet propustný pro soli a nízkomolekulární látky. Její hlavní funkcí je ochrana před mechanickým poškozením buňky. Díky buněčné stěně je rozbití bakteriální buňky možné silným a dlouhodobým působením okolních vlivů (Čechová *et* Janalíková, 2007; Ghuysen *et* Hakenbeck, 1994; Kaprálek, 2000).



Obr. 3.: Rozdíly v buněčné stěně Gram-pozitivní a Gram-negativní bakteriální buňky (převzato a upraveno Humagin 2018).

Buněčná stěna Gram-pozitivních a Gram-negativních kmenů je odlišná (obr. 3). Pro oba typy bakteriálních kmenů je společný peptidoglykan zajišťující mechanickou pevnost a dávající buňce její tvar. Buněčná stěna Gram-pozitivních bakterií je poměrně silná (15–80 nm), peptidoglykanem prostupují řetězce teichoových kyselin. Tyto řetězce tvoří ve vodě rozpustné polymery a jsou kovalentně navázané k peptidoglykanu. U různých bakteriálních kmenů stejného druhu můžeme pozorovat několik typů těchto polymerů. Hlavní funkcí je role povrchového antigenu a vazba kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} .

Buněčná stěna Gram-negativních bakterií se od předešlého typu liší především tloušťkou. Gram-negativní kmeny mají tuto stěnu tlustou pouze 10 nm, je méně hmotná, ale stavebně složitější. Nad vrstvou peptidoglykanu se nachází vnější membrána. Tato membrána je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů vázanou oboustranně proteiny, kterých je méně než v cytoplazmatické membráně. Fosfolipidy vnější vrstvy jsou nahrazeny lipopolysacharidy. Vyskytují se zde i poriny, nespecifické póry a kanály, které umožňují

neselektivní průnik malých hydrofilních molekul přes tuto vnější vrstvu až k cytoplazmatické membráně. Vnější membrána je k peptidoglykanu připojena pomocí molekul lipoproteinu, kdy jeden konec kovalentně váže peptidoglykan a druhý je poután k dvojvrstvě vnější membrány prostřednictvím lipofilního N-konce tvořeného cysteinem. Mezi oběma membránami vzniká prostor, který se nazývá periplasmový. Nalezneme zde velké množství molekul: metabolity, enzymy, β -laktamázy, které udělují rezistenci díky štěpení penicilinu. Tyto molekuly jsou u Gram-pozitivních bakterií vylučovány do prostředí (Čechová *et Janalíková*, 2007; Green, 2002; Kaprálek, 2000; Maisch *et al.*, 2004).

9.4. Gram-pozitivní bakteriální kmeny

9.4.1. Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

Meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je Gram-pozitivní patogen (obr. 4), který získal rezistenci vůči antibiotiku meticilinu. Tyto kmeny jsou kromě meticilinu rezistentní i vůči ostatním antibiotikům ze skupiny beta-laktamů prostřednictvím exprese exogenního genu *mecA*. *S. aureus* často kolonizuje nosní vestibul a kůži zdravých lidí a může způsobit závažnou infekci. Představuje jeden v hlavních problémů především v nemocnicích. Vysoký výskyt MRSA způsobuje klinickou a ekonomickou zátěž nemocnic, způsobuje dlouhodobější pobyt v nemocnici a vyšší úmrtnost zejména z důvodu opožděného zahájení vhodné terapie (European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015; 2017).



Obr. 4.: Kultivační agar s koloniemi meticilin-rezistentního *S. aureus* (MRSA)

9.4.2. *Enterococcus faecalis*

Další námi studovaný Gram-pozitivní bakteriální kmen byl *Enterococcus faecalis* (obr. 5), který tvoří přirozenou mikroflóru ve střevech lidí. Způsobuje infekce močových a žlučových cest, gynekologické záněty, pooperační komplikace u operací dutiny břišní. Je vysoce rezistentní k antibiotikům, především u nozokomiálních kmenů (Beneš, 2009).



Obr. 5.: Kultivační agar s koloniemi Enterococcus faecalis

9.5. Gram-negativní bakteriální kmeny

9.5.1. *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy

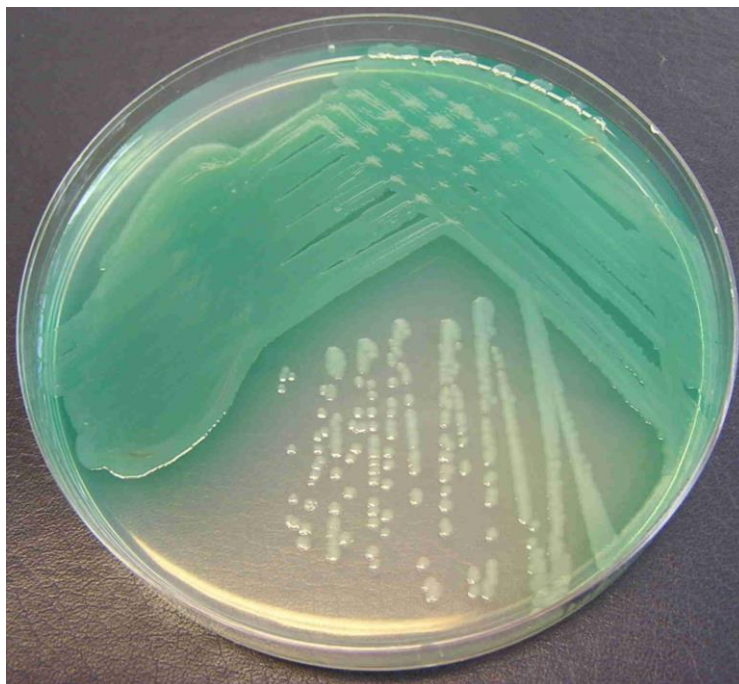
Klebsiella pneumoniae produkující širokospektré β -laktamázy patří mezi opouzdřené Gram-negativní nepohyblivé tyčky (obr. 6). Tento druh bakterií je součástí mikrobiální flóry a respiračního ústrojí, dále se vyskytují v půdě a ve vodě. Nejčastěji způsobují uroinfekce a pneumonie, uplatňují se i v sepsi především u nozokomiální nákazy (Beneš, 2009).



Obr. 6.: Kultivační agar s koloniemi *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy.

9.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (obr. 7) patří mezi Gram-negativní, aerobní, pohyblivé, nefermentující bakterie. Může být obalena slizovou vrstvou podobnou bakteriálnímu pouzdru. Vyskytuje se v odpadních vodách, v půdě a na rostlinách. *P. aeruginosa* především kolonizuje sliznice respiračního traktu a močového ústrojí (Bednář, 1996).



Obr. 7.: Kultivační agar s koloniemi *Pseudomonas aeruginosa*

10. Moderní mikroskopické metody

10.1. Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je jedna z technik spadající do mikroskopie skenující sondou, které se zabývají studiem struktury povrchu s atomárním rozlišením a možností stanovit trojrozměrné (3D) obrazce povrchu včetně jejich parametrů. Mikroskopie pracuje na principu tunelového jevu vycházejícího z poznatků kvantové fyziky. Při samotném snímání je využíváno těsného přiblížení a přesného polohování sondy k povrchu vzorku (Kubínek, *et al.*, 2003). Pohyb sondy umožňuje piezoelektrická keramika zajišťující řádkové snímání v rovině x a y , pohyb ve směru osy z se řídí signálem zpětné vazby (Prado *et al.*, 2012). Oproti ostatním metodám např. elektronové mikroskopii je příprava vzorků nenáročná, ale výsledky poskytují jen informace o povrchu vzorku. AFM neposkytuje okamžitý vizuální obraz, ale povrch vzorku je postupně snímán a zobrazován na počítači (Kubínek *et al.*, 2003).

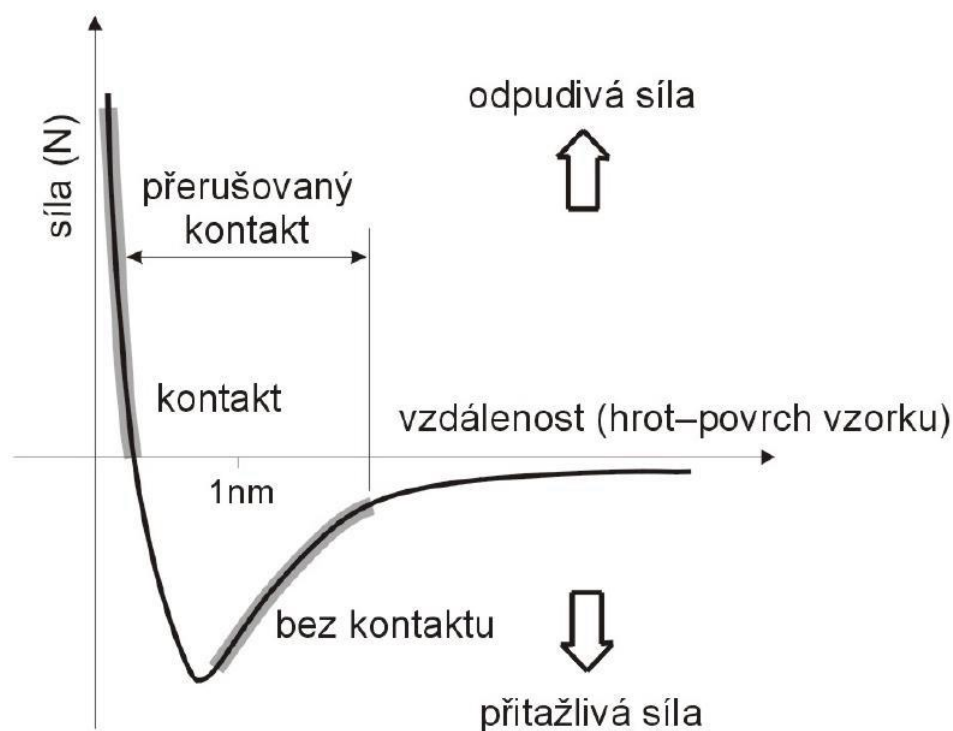
10.2. Princip AFM

Hlavním prvkem AFM je sonda složená z ostrého hrotu vyleptaného na konci pružného nosníku (cantilever). Nosníky s hroty jsou základem AFM mikroskopu, jelikož zprostředkují interakci mezi hrotem a povrchem vzorku. Hrot má nejčastěji tvar písmene V a je vyroben z křemíku (Si) nebo nitridu křemíku (Si_3N_4). Vrchol hrotu má nejčastěji poloměr do 10 nm u křemíkových hrotů a 20 – 60 nm u hrotů z nitridu křemíku (Jandt, 2001). Obvyklá délka nosníku je 100 – 200 μm , šířka 10 – 40 μm a jeho tloušťka je 0,3 – 2 μm . Další důležitou vlastností je tuhost, pružnost nosníku, která by měla být nižší, než je vazebná síla mezi atomy v pevných látkách z důvodu zabránění poškození hrotu nebo samotného vzorku (Eaton *et West*, 2010; Kubínek *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2012). Změny nosníku jsou během měření zaznamenávány pomocí laserového paprsku fokusovaného na volný konec nosníku. Odraz paprsku je poté detekován fotodiodou rozdělenou na čtyři části (Kuznetsova *et al.*, 2007).

Změny nosníku jsou závislé na topografii skenovaného vzorku, změny v prohnutí nosníku jsou způsobeny různou vzdáleností mezi hrotem a vzorkem, přičemž vzdálenost a velikost interakce je neustále kontrolována pomocí zpětné vazby pozičního systému a počítačově řízených piezo prvků. Rozlišení je dáno vlastnostmi sondy, konfigurací počítače při tvorbě obrazu a dynamické povaze zobrazovaného vzorku (Gaczynska *et Osmulski*, 2008).

10.3. Zobrazovací režimy AFM

U AFM metody můžeme rozlišovat tři základní zobrazovací režimy (obr. 8) na základě interakce mezi hrotem a povrchem vzorku – kontaktní mód, nekkontaktní mód a pokleповý mód (Barabaszová, 2014; Eaton *et West*, 2010).



Obr. 8.: Graf působících sil v závislosti na vzdálenosti (Kubínek *et al.*, 2003).

10.3.1. Kontaktní mód

V kontaktním režimu je vzdálenost hrotu od povrchu vzorku menší než několik desetin nm. Mezi nosníkem a vzorkem převládá odpudivá síla, která se snaží vychýlit nosník od povrchu vzorku. V kontaktním módu bývá síla působící na vzorek řádově 10^{-7} N. Zásadní roli v tomto typu měření má tuhost hrotu, jestliže je větší než efektivní tuhost držící pohromadě atomy povrchu, nosník se neohne a může dojít k poškození vzorku. Kvalitu měření dále mohou zhoršovat kapičky vody zkondenzované na povrchu vzorku. Kontaktní režim nabízí dvě varianty měření – s konstantní výškou, kdy je konstantní výška nosníku nad povrchem a je snímáno ohnutí nosníku, a s konstantní silou, kdy je udržováno určité prohnutí nosníku (Kubínek *et al.*, 2003). Kontaktní mód dosahuje velkého rozlišení, ale je vhodný pouze pro tvrdé vzorky, u měkkých vzorků by mohlo dojít k jejich poškození (Eaton *et West*, 2010; Jalili *et Laxminarayana*, 2004; Kubínek *et al.* 2001).

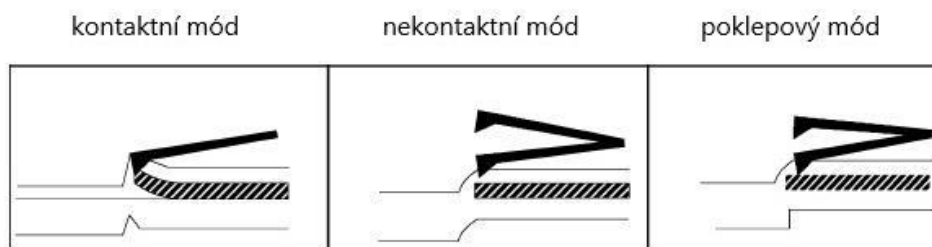
10.3.2. Nekontaktní mód

Nekontaktní režim pracuje v oblasti přitažlivých van der Waalsových sil, jednotky až desítky nm od povrchu vzorku. Hrot je umístěn na nosníku s vyšší tuhostí, aby se

zabránilo poškození vzorku. Celková síla mezi hrotem a vzorkem je velmi malá a pohybuje se okolo 10^{-12} N. Nosník s hrotem kmitá v blízkosti své rezonanční frekvence. Nevýhodou tohoto módu je snímání mikrokapek zkondenzované vody na povrchu vzorku (Eaton *et West*, 2010; Jalili *et Laxminarayana*, 2004).

10.3.3. Poklepový mód

Poklepový režim neboli semicontact je podobný nekontaktnímu režimu. Nosník kmitá s frekvencí blízkou své rezonanční, ale rozkmit je větší, a proto dochází ke kontaktu s povrchem vzorku. Oproti kontaktnímu módu má tento režim několik výhod. Obraz opět vzniká na základě změny rezonanční frekvence (Jalili *et Laxminarayana*, 2004). Jednotlivé typy módů jsou schématicky vyobrazeny na obr. 9.



Obr. 9.: Schematické znázornění jednotlivých operačních režimů AFM. (Jalili *et Laxminarayana*, 2004)

11. Cíle práce

- ověřit účinek antimikrobiální fotodynamické inaktivace na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech
- stanovit optimální parametry fotodynamické reakce aplikované na bakteriální kmeny
- stanovit optimální parametry fotodynamické reakce v kombinaci s nanočásticemi stříbra
- ověřit synergický efekt kombinace aPDI a nanočástic stříbra
- ověřit antimikrobiální vlastnosti TPP-NP na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech.
- ověřit možnosti použití kurkumínu v aplikaci aPDI

12. Experimentální část

12.1. Materiál a metody

12.1.1. Bakteriální kmeny

Všechna experimentální měření byla provedena na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriálních kmenech. Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* CCM 4591 (MRSA) a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly použity jako zástupce Gram-pozitivních kmenů, *Klebsiella pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy CCM 2486 (ESBL-KP) a *Enterococcus faecalis* CCM 4224 jako Gram-negativní bakteriální kmeny. Bakterie byly inokulovány na krevní agar (Trios, Česká Republika) a byly kultivovány při 35°C po dobu 24 hodin. Pro jednotlivé experimenty byly použity čerstvé kolonie bakterií. Bakteriální suspenze byla připravena pro každý antibakteriální test a koncentrace bakterií byly stanoveny měřením optické hustoty pomocí densilometru (Densi-La-Meter, LACHEMA, Česká Republika).

12.1.2. Porfyrinový fotosensitizer TMPyP a nanočástice stříbra AgNPs

Na výše uvedených bakteriálních kmenech byla ověřována účinnost komerčně dostupného TMPyP (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium) porphyrin tetra(p-toluenesulfonát)) (Sigma-Aldrich) v kombinaci s nanočásticemi stříbra (AgNPs). Studované koncentrace TMPyP byly v rozmezí 1,56 až 100 μM , toto rozmezí bylo zvoleno na základě dříve získaných výsledků (Hanáková *et al.*, 2013). Maximální absorpční vlnové délka TMPyP je 421 nm (Sigma-Aldrich), proto byl TMPyP aktivován pomocí LED zářiče emitujícího světlo o vlnové délce 415 ± 10 nm. Námi ověřované stříbrné nanočástice byly připraveny Alešem Panáčkem (Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci), jejich velikost byla 27 nm v průměru. Nanočástice byly připraveny podle již dříve publikovaného Tollenova procesu zahrnujícího redukci komplexního kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ D-maltózou v alkalickém prostředí (Panáček *et al.*, 2006). Koncentrace použitých reakčních složek byla: dusičnan stříbrný 1×10^{-3} mol/l, amoniak 5×10^{-3} mol/l, hydroxid sodný $9,6 \times 10^{-3}$ mol/l a D-maltóza jako redukční činidlo 1×10^{-2} mol/l. Tento reakční systém byl kontinuálně míchán magnetickým míchadlem. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě (přibližně 21 °C). Konečný roztok AgNO_3 s koncentrací stříbra

108 mg/l (přibližně 1×10^{-3} mol/l) byl připraven rozpuštěním AgNPs v destilované vodě a jeho uskladněním ve tmě. UV-VIS spektra připravených AgNPs byla měřena spektrofotometrem Specord S 600 (Analytik Jena, Německo) a průměr částic AgNPs byl měřen metodou dynamického rozptylu světla (DLS) pomocí Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Takto připravené nanočástice byly studovány a ověřovány z hlediska jejich fyzikálních, chemických a biologických vlastností také v jiných studiích (Panáček *et al.*, 2015; Jiravová *et al.*, 2016). V této studii byly studované koncentrace AgNPs vybrány podle geometrické řady (54 - 0,025 mg/l).

12.1.3. Polystyrenové nanočástice s navázaným hydrofobním fotosensitizerem TPP (TPP-NPs)

Podílela jsem se na vývoji stabilních sulfonovaných polystyrenových nanočástic (průměr 15 ± 7 nm) se zapouzdřeným hydrofobním fotosensitizerem TPP (5,10,15,20-Tetraphenylporphyrin) (TPP-NPs), které byly připravovány Jiřím Mosingerem (Ústav anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze). Tetraphenylporphyrin (TPP) je komerčně dostupný porfyrinový fotosensitizer (Sigma-Aldrich). Nanočástice s určitým množstvím enkapsulovaného TPP (5×10^{-4} mol/l) byly připraveny mírně modifikovanými nanoprecipitačními metodami s použitím nanovlákných membrán Petrem Henkem z Katedry anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Česká republika.

Nanovlákné membrány byly uchyceny na podkladová sklíčka a ta poté byla vložena do vyvíjecích tanků pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) s 96 % H_2SO_4 . Po sulfonaci byly nanovlákné membrány promývány destilovanou vodou, dokud nebylo dosaženo neutrálního pH. Vlhké membrány byly vloženy do čistého tetrahydrofuranu (THF) obsahujícího fotosensitizer TPP a byly intenzitně míchány do rozpuštění. Přidáním destilované vody došlo k vysrážení nanočástic a tato suspenze byla centrifugována za účelem odstranění větších mikročástic. Nakonec byla disperze nanočástic dialyzována při pokojové teplotě po dobu 3 dnů, aby došlo k odstranění zbytků kyseliny sírové a THF. Koncentrace TPP-NPs byla 3 mg/ml, přičemž koncentrace zapouzdřeného TPP byla 10 % v nanočásticích, což odpovídá 5×10^{-4} mol/l TPP v zásobním roztoku. Koncentrace zásobního roztoku byla vypočtena pomocí gravimetrické analýzy, kdy bylo 20 ml vzorku nanočástic vysušeno při 50 °C. Hmotnost byla stanovena na analytických vahách GR-200

(A&D Instruments Ltd., Japan). Zásobní koncentrace NPs byla vypočtena z hmotnosti suchého vzorku a molární hmotnosti ($3,2 \text{ mg/ml}$ a $6,8 \times 10^7 \text{ g/mol}$). Zásobní disperze TPP-NPs ($\sim 3 \times 10^{13} \text{ NPs/ml}$) byla skladována ve tmě. Velikost a distribuce velikosti částic ve vodě byla stanovena pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) na analyzátoru velikosti částic Zetasizer Nano ZS, Malvern.

12.1.4. Polymerní nanočástice PLGA s navázaným kurkumínem (CUR)

Posledními studovanými látkami byly polymerní nanočástice PLGA s navázaným kurkumínem (PLGA-CUR), které byly syntetizovány a ověřovány na Univerzitě v Miláně v rámci mé půlroční zahraniční stáže. PLGA mikročástice byly připraveny metodou dvojité emulze (olej/voda) za použití polyvinyl alkoholu (PVA) jako povrchově aktivní látky. Nejprve bylo 40 mg PLGA polymeru smícháno s $0,8 \text{ ml}$ ethylacetátu a poté bylo přidáno $1,6 \text{ ml}$ PVA 1% . Tato směs byla míchána vysokorychlostním homogenizérem (IKA T25 digital ULTRA TURRAX) po dobu 30 s při 3400 otáčkách za minutu. Po dosažení mléčné emulze bylo do suspenze přidáno 8 ml destilované vody a $200 \mu\text{l}$ ethylacetátu. Takto připravená suspenze se nechala míchat přes noc na magnetické míchače a došlo k odpaření organického rozpouštědla. Získané mikročástice byly druhý den třikrát promyty v destilované vodě. Pro přípravu mikročástic s kurkumínem bylo při jejich syntéze přidáno $7,5 \text{ mg}$ kurkumínu k PLGA polymeru. Před samotným použitím na bakteriálních kmenech byly všechny vzorky rozsuspendovány a naředěny ve fosfátovém pufru (PBS) na studované koncentrace.

Takto připravené mikročástice byly podrobeny spektrální analýze pro zhodnocení jejich stability. Excitační a emisní spektra mikročástic s navázaným kurkumínem a spektra samotného kurkumínu byla měřena pomocí fluorescenčního spektrometru (FluoroMax 4, Horiba). Na základě této spektrometrické analýzy byla hodnocena chemická stabilita mikročástic s navázaným kurkumínem a kurkumínu samotného. Emise fluorescence ($A_{\text{Ex}} = 450 \text{ nm}$, $A_{\text{Em}} = 480 \text{ nm}$) byla měřena v několika časových intervalech (0 , 18 a 43 hod) při pokojové teplotě a každé měření bylo provedeno v triplicátu.

12.1.5. Zdroje záření

Jako zdroj záření pro ověřování vzorků na Univerzitě Palackého v Olomouci byl použit systém LED diod emitující viditelné záření o vlnové délce 414 nm navržený na

našem pracovišti (National Patent CZ 302829) k ozáření Petriho misek. Intenzita světelného zdroje byla 54 mW/cm². Hustoty plošné světelné energie použité k aktivaci fotosensitizeru TMPyP kombinovaného s AgNPs byly 10 a 20 J/cm², což odpovídá ozařovacím časům 3 min 20 s a 6 min 40 s. Pro aktivaci TPP-NPs byly hodnoty hustoty energie 1,62; 3,24; 16,2; 32,4 J/cm², kdy ozařovací časy byly 0,5; 1; 5 a 10 minut. Měření parametrů ozáření bylo provedeno pomocí radiometru ILT 1700 vybaveného senzorem SED033 (International Light Technologies). Ozáření bylo provedeno pomocí světelného zdroje zhotoveného z pole 350 ks 5 mm LED (o celkové velikosti 9 x 13 cm).

Vzorek polymerních nanočástic PLGA s navázaným kurkumínem byl ozařován viditelným zářením, které bylo emitováno LED lampou (CorePro LED linear R7S 118 mm 14–100 W 830 D), čas ozařování se pohyboval v rozmezí od 0 do 1 minuty.

12.1.6. Synergický efekt kombinace fotosensitizeru a nanočástic stříbra na bakteriálních kmenech

V naší *in vitro* studii synergického efektu kombinace fotosensitizeru TMPyP a AgNPs byly použity tyto bakteriální kmeny meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) a *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (ESBL-KP). Bakterie byly naočkovány na krevní agar obsahující 5% defibrinované ovčí krve (Trios) a kultivovány 24 hodin při 35 °C ve tmě. K ověřování byly použity čerstvé kolonie bakterií, které byly rozsuspendovány ve 2 ml fyziologického roztoku. Finální bakteriální koncentrace (CFU/ml) každé suspenze byla stanovena měřením optické hustoty densilametrem (Densi-La-Meter, Lachema, Czech Republic).

Samotné měření bylo provedeno v 12-jamkových deskách. Bakteriální suspenze byla naředěna v Müller-Hintonově (MH) médiu (Boi-Rad Laboratories, USA) do finální koncentrace 10⁸ CFU/ml. Následně byl dodán fotosensitizer TMPyP v koncentračním rozmezí 1,56 až 200 μ M + kontrola bez fotosensitizeru. Takto připravené panely byly inkubovány za konstantního třepání při 35 °C ve tmě po dobu 45 min nebo 5 hodin. Dva inkubační časy byly zvoleny z důvodu porovnání rychlosti akumulace TMPyP do bakteriálních buněk. Dále byla připravena kontrolní zkumavka s bakteriální suspenzí, u které byl změřen její zákal ihned po přípravě a poté znovu po 5 hodinové inkubaci pro stanovení bakteriálního růstu v čase.

Po kultivaci bakterií s TMPyP bylo 50 μl suspenze přeneseno do nové 12-jamkové desky s 450 μl PBS, tedy koncentrace bakterií pro ozáření byla 10x zredukována. Panely byly ozářeny viditelným zářením o vlnové délce 414 nm a intenzitě záření 54 mW/cm^2 , kdy ozařovací časy byly 185 s a 370 s, což odpovídá 10 J/cm^2 nebo 20 J/cm^2 . Po ozáření byl 1 μl bakteriální suspenze přenesen pomocí očkovacího ježka do 99 μl MH média nachystaného v nové 96-jamkové mikrotitrační desce, ve které byly dle koncentrační řady (108; 54; 27; 13,5; 6,7; 3,4; 1,7; 0,8; 0,2 a 0,1 μl) nařaděny nanočástice stříbra. V případě 5 hodinové inkubace bylo množství PBS a množství přenášené bakteriální suspenze stanoveno na základě bakteriálního růstu v kontrolní zkumavce během 5 hodin, tedy koncentrace bakterií vystavena aPDI byla stejná pro oba inkubační časy. Naočkované panely byly kultivovány při 35 °C, 5 % CO_2 po dobu 24 hodin, po inkubaci byl vyhodnocen růst bakterií a pomocí frakční inhibiční koncentrace (FIC) byl stanoven synergický účinek kombinace fotosensitizeru a nanočástic stříbra.

12.1.7. Stanovení synergického účinku fotosensitizeru a nanočástic stříbra

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) stříbrných nanočástic (AgNPs), porfyrinového fotosensitizeru (TMPyP) a jejich kombinace na jedné mikrotitrační desce byla použita modifikovaná mikrodilutační metoda (MIC), která je popsána v příručce *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (Isenberg, 2004). AgNPs byly zředěny v médiu HM v mikrotitrační desce v koncentračním rozmezí 54 - 0,025 mg/l. Bakteriální suspenze, ošetřené fotodynamickou terapií popsané výše, byly přidány do jamek s nanočásticemi stříbra s následnou inkubací při 35 °C ve tmě po dobu 24 hodin.

Antimikrobiální aktivita byla hodnocena podle standardních testovacích protokolů (CLSI, EUCAST) a minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena jako nejnižší koncentrace studované látky, která viditelně inhibuje růst bakteriálního kmene po 24 hodinách inkubace při 35 °C. Frakční inhibiční koncentrace (FIC) byla vypočtena podle dokumentu Evropského výboru pro testování citlivosti na antibiotika (EUCAST) (Kahlmeter *et al.*, 2006) s použitím následujícího vzorce:

$$FIC_{index} = FIC_{AgNPs} + FIC_{TMPyP}$$

kde

$$FIC_{AgNPs} = \frac{MIC_{AgNPs \text{ v kombinaci s TMPyP}}}{MIC_{AgNPs \text{ samotného}}} \text{ and } FIC_{TMPyP} = \frac{MIC_{TMPyP \text{ v kombinaci s AgNPs}}}{MIC_{TMPyP \text{ samotného}}}$$

Vzhledem k tomu, že modifikovaná mikrodilutační metoda vedla k určitému počtu FIC, byl vypočten FIC_{index} . Tento index byl použit pro klasifikaci kombinovaného antimikrobiálního účinku fotosensitizeru TMPyP a AgNPs jako synergického ($FIC_{index} \leq 0,5$), aditivního ($0,5 < FIC_{index} \leq 1$), indiferentního ($1 < FIC_{index} < 2$), a antagonistické ($FIC_{index} \geq 2$).

- Synergie – Synergický účinek kombinace antibiotik nebo antibiotik a neaktivních látek je přítomen, pokud účinek kombinace překročí aditivní účinky jednotlivých složek.
- Adice – Aditivní účinek kombinace fotosensitizeru je účinek, při kterém je účinek kombinace stejný jako účinek součtu účinků jednotlivých složek.
- Indiference – Indiferenční účinek kombinace fotosensitizeru a nanočástic je ten, který se rovná účinkům neúčinnější složky.
- Antagonismus – Antagonismus je přítomen, pokud je pozorován snížený účinek kombinace antibiotik ve srovnání s účinkem neúčinnější jednotlivé látky.

12.1.8. Antimikrobiální fotodynamická terapie aplikovaná na bakteriální kmeny (TPP-NPs)

Pro přípravu čerstvých bakteriálních kmenů byly odebrány 1 – 2 kolonie studovaných Gram-pozitivních kmenů meticilin-rezistentní *S. aureus*, *P. aeruginosa* a Gram-negativních kmenů *K. pneumoniae* produkující širokospektré β – laktamázy a *E. faecalis*. Odebrané kolonie se nechaly narůst v aerobních podmínkách v bujónu (Himedia) při 37 °C, 5 % CO₂ ve tmě do druhého dne. Finální koncentrace zásobního roztoku bakteriální suspenze byla v řádu 10³ CFU/ml. Pro fotodynamický experiment byla 10x naředěná zásobní disperze TPP-NPs (~ 3x 10¹² NPs/ml) smíchána v poměru 1:1

se zásobní bakteriální suspenzí. Dva mililitry takto připravené disperze byly přeneseny do Petriho misky (Ø 35 mm) a při pokojové teplotě byly různě dlouhou dobu ozářeny LED světelným zdrojem produkujícím viditelné záření (414 nm). Po světelné expozici bylo 100 µl této disperze nanášeno na agarové plotny, které byly následně inkubovány ve tmě při 35 °C po dobu 24 hodin, aby umožnily jednotlivým bakteriím růst a vytvářet kolonie (Dolanský *et al.*, 2018).

12.1.9. Mikroskopická detekce buněčné smrti – AFM

Bakteriální vzorky pro AFM analýzu byly připraveny podle protokolu popsánoho Robichonem (Robichon *et al.*, 1999). Stručně, 5 µl (10^3 CFU/ml) fotodynamicky ošetřených nebo neošetřených bakterií bylo nanášeno na čisté sklíčko (Knittel glass) a usušeno na vzduchu při pokojové teplotě (22 °C, vlhkost 50 %) po dobu 5 minut. Bakterie byly zobrazeny v bezkontaktním módu za použití silikonového hrotu ScanAssyst-FLUID+ umístěného na nitridovém nosníku s rezonanční frekvencí 100 – 200 kHz a pružinový kontakt byl $0,7 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Rychlost skenu byla 0,5 Hz a oblast skenu byla 3 µm. Pro topografické snímky, jak ošetřených tak neošetřených buněk, byl pro měření jejich průměru použit software Gwydion 2.40. Pro každý vzorek (kontrola, fotodynamicky ošetřené bakterie) bylo zobrazeno 50 buněk, aby se zjistil účinek fotodynamického ošetření na morfologie buněčného povrchu. Analýza byla provedena ve třech opakování při $3,24 \text{ J}/\text{cm}^2$.

12.1.10. Statistika

Výsledky experimentů provedených s TPP-NPs na bakteriálních kmenech jsou uváděny jako průměry včetně směrodatné odchylky (SD) a byly statisticky zpracovány. Rozdíly mezi dvěma nezávislými skupinami (světlo a tma) byly stanoveny pomocí nezávislého dvouvýběrového t-testu. Výsledky s p hodnotou menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné. Všechny statistické analýzy byly provedeny použitím IBM SPSS Statistics pro Windows, verze 23.0. Amonk, NY: IBM Corp. Statistická signifikance byla určena pro * $p < 0,05$ (významný), ** $p < 0,01$ (velice významný), *** $p < 0,001$ (extrémně významný).

12.1.11. Kurkumín a jeho využití v antimikrobiální fotodynamické inaktivaci

Pro ověření antimikrobiálních vlastností kurkumínu a jeho použití v aPDI byl využit Gram-pozitivní bakteriální kmen, *S. aureus*. Narostlé kolonie byly naředěny na požadovanou koncentraci v PBS (10^3 CFU/ml) a následně byla tato suspenze smíchána v poměru 1:1 se studovaným vzorkem (PLGA, PLGA-CUR nebo kurkumín). Poté byl takto připravený vzorek ozářen LED lampou po dobu 1 minuty. Následně bylo 100 μ l takto ošetřené suspenze vyneseno na agarovou plotnu a inkubováno ve tmě při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Druhý den byly spočítány narostlé kolonie bakterií. Jako kontrolní vzorky byly použité samotné mikročástice a samotný kurkumín. Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních. Získané výsledky byly následně graficky zaznamenány.

13. Výsledky

13.1. Synergický efekt TMPyP a AgNPs

Antibakteriální aktivity nanočástic stříbra, světlem aktivovaného TMPyP a jejich kombinace vůči MRSA a ESBL-KP byla pozorována pomocí mikrodilutační metody, která byla provedena na 96-jamkových kultivačních deskách. Růst bakteriálních kmenů byl vizuálně pozorován po 24 hodinové inkubaci po ošetření. Výsledky jsou prezentovány na obrázku 10 a 11, šedě jsou označeny ty jamky, kde byl pozorován bakteriální růst. Bíle jsou prezentovány jamky, kde naopak nebyl pozorován růst bakterií. Synergický efekt kombinace fotosensitizeru TMPyP v kombinaci s nanočásticemi stříbra byl stanoven pomocí FIC (Frakční Inhibiční Koncentrace). Zjistili jsme, že kombinace TMPyP a AgNPs vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči vybraným multiresistentním bakteriálním kmenům, což se odráží v nízké hodnotě FIC.

Naše výsledky ukázaly, že růst *S. aureus* (MRSA) byl inhibován jak vlivem AgNPs, tak účinkem aPDI s TMPyP. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) stříbrných nanočástic byla 3,38 mg/l. V případě použití aPDI samostatně bylo pro inhibici růstu bakterií nutné použít TMPyP v koncentračním rozmezí od 100 do 25 μ M v závislosti na inkubační době a intenzitě záření. V případě kombinované terapie byly jejich MIC významně sníženy, dokonce byl pozorován synergický účinek. Při krátké inkubaci

bakterií s TMPyP (45 minut) a nízké hustotě světelné energie (10 J/cm^2) byl pozorován synergický účinek, pokud koncentrace TMPyP byla v rozmezí 1,56 až 25 μM a koncentrace AgNPs byla 3,38 mg/l (obr. 10A). V případě delší inkubace TMPyP a/nebo delším ozáření byl pozorován synergický efekt i v případě nižších koncentrací TMPyP, pravděpodobně díky vysoké hodnotě FIC TMPyP nízké hodnotě MIC TMPyP (obr. 10B-D).

A

Inkubace 45 minut, hustota světelné energie 10 J/cm²

													TMPyP (μM)						
						1,00 0,13	1,13	1,00 0,06	1,06	1,00 0,03	1,03	1,00 0,02	1,02	1,00 0,01	1,01	1,00 0,00	1,00	MIC TMPyP alone	100,00
				0,50 0,25	0,75														50,00
				0,25 0,25	0,50														25,00
				0,13 0,25	0,38														12,50
				0,06 0,25	0,31														6,25
				0,03 0,25	0,28														3,13
			0,02 0,50	0,52	0,02 0,25	0,27													1,56
			MIC AgNPs alone																0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00							

FIC TMPyP
FIC AgNPs

FIC_{index}

B

Inkubace 45 minut, hustota světelné energie 20 J/cm²

													TMPyP (μM)							
																				100,00
						1,00 0,13	1,13	1,00 0,06	1,06	1,00 0,03	1,03	1,00 0,02	1,02	1,00 0,01	1,01	1,00 0,00	1,00	MIC TMPyP alone	50,00	
				0,50 0,25	0,75															25,00
				0,25 0,25	0,50															12,50
				0,13 0,25	0,38															6,25
				0,06 0,25	0,31															3,13
			0,03 0,50	0,53	0,03 0,25	0,28														1,56
			MIC AgNPs alone																	0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00								

FIC TMPyP
FIC AgNPs

FIC_{index}

C

Inkubace 5 hodin, hustota světelné energie 10 J/cm²

													TMPyP (μM)							
																				100,00
						1,00 0,13	1,13	1,00 0,06	1,06	1,00 0,03	1,03	1,00 0,02	1,02	1,00 0,01	1,01	1,00 0,00	1,00	MIC TMPyP alone	50,00	
				0,50 0,25	0,75															25,00
				0,25 0,25	0,50															12,50
				0,13 0,25	0,38															6,25
				0,06 0,25	0,31															3,13
			0,03 0,50	0,53	0,03 0,25	0,28														1,56
			MIC AgNPs alone																	0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00								

FIC TMPyP
FIC AgNPs

FIC_{index}

koncentrací TMPyP. Navíc se zdá, že aPDI pomocí TMPyP hraje v synergickém efektu větší roli, protože hodnoty FIC_{TMPyP} jsou menší než FIC_{AgNPs} (obr. 10 a 11).

A

Inkubace 45 minut, hustota světelné energie 10 J/cm²

		Inkubace 45 minut, hustota světelné energie 10 J/cm ²											MIC TMPyP alone (200 μM)	TMPyP (μM)			
FIC TMPyP FIC AgNPs FIC _{index}					0,50 0,13	0,63	0,50 0,06	0,56	0,50 0,03	0,53	0,50 0,02	0,52	0,50 0,01	0,51			100,00
					0,25 0,25	0,50											50,00
					0,13 0,25	0,38											25,00
					0,06 0,25	0,31											12,50
					0,03 0,25	0,28											6,25
					0,02 0,25	0,27											3,13
					0,01 0,50	0,51	0,01 0,25	0,26									1,56
					MIC AgNPs alone												0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00					

B

Inkubace 45 minut, hustota světelné energie 20 J/cm²

		Inkubace 45 minut, hustota světelné energie 20 J/cm ²											TMPyP (μM)					
FIC TMPyP FIC AgNPs FIC _{index}																	100,00	
																	MIC TMPyP alone	50,00
						0,50 0,13	0,63	0,50 0,06	0,56	0,50 0,03	0,53	0,50 0,02	0,52	0,50 0,01	0,51	0,50 0,00		25,00
					0,25 0,25	0,50												12,50
					0,13 0,25	0,38												6,25
					0,06 0,25	0,31												3,13
					0,03 0,50	0,53	0,03 0,25	0,28										1,56
					MIC AgNPs alone													0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00						

Inkubace 5 hodin, hustota světelné energie 10 J/cm²

												TMPyP (μM)
												100,00
												50,00
												25,00
												12,50
												6,25
												3,13
												1,56
												0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00

Inkubace 5 hodin, hustota světelné energie 20 J/cm²

												TMPyP (μM)
												100,00
												50,00
												25,00
												12,50
												6,25
												3,13
												1,56
												0,00
AgNPs (mg/l)	54,00	27,00	13,50	6,75	3,38	1,69	0,84	0,42	0,21	0,11	0,05	0,00

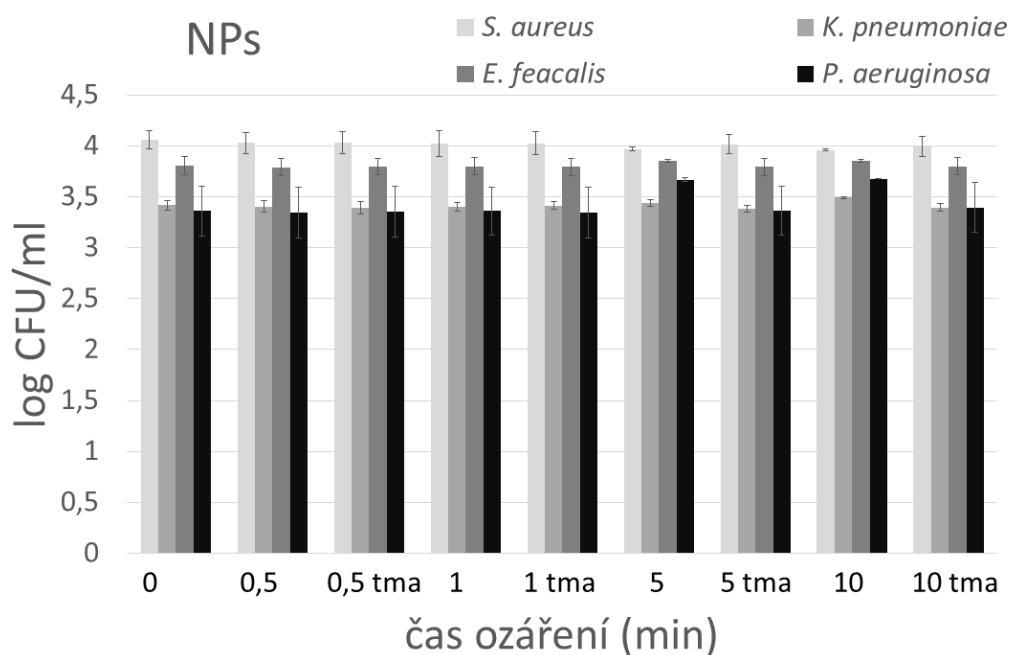
Obr. 11.: Minimální inhibiční koncentrace (MIC), frakční inhibiční koncentrace (FIC) a index frakční inhibiční koncentrace kombinace TMPyP a AgNPs vůči ESBL-KP. A: 45 minutová inkubace s TMPyP, hustota světelné energie 10 J/cm², B: 45 minutová inkubace s TMPyP, hustota světelné energie 20 J/cm², C: 5 hodinová inkubace s TMPyP, hustota světelné energie 10 J/cm² a D: 5 hodinová inkubace s TMPyP, hustota světelné energie 20 J/cm². Šedě jsou označeny ty jamky, kde byl pozorovaný růst bakterií. Bíle jsou označeny ty jamky, kde bakterie nerostly. Jamky bez TMPyP (0 μM) a AgNPs (0 mg/l) reprezentují účinek samotného světla. Limity pro stanovení antibakteriální interakce aPDI pomocí TMPyP a AgNPs jsou a) synergie ($FIC_{index} \leq 0,5$), b) aditivní ($0,5 < FIC_{index} \leq 1$), c) indiferentní ($1 < FIC_{index} < 2$), a d) antagonistický ($FIC_{index} \geq 2$).

Závěrem můžeme říci, že oba multiresistentní bakteriální kmeny mohou být považovány za citlivé k antimikrobiální fotodynamické inaktivaci za použití TMPyP v kombinaci s AgNPs.

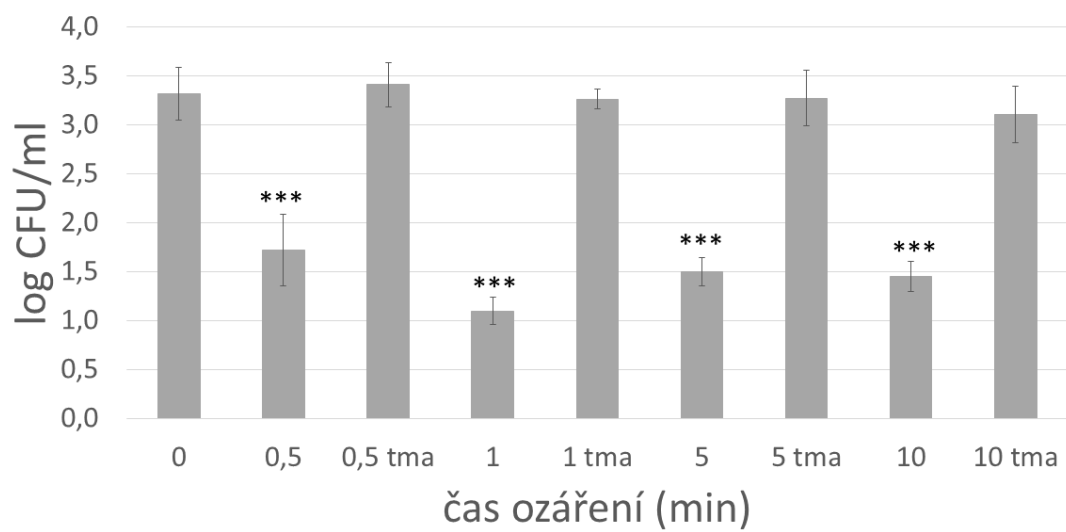
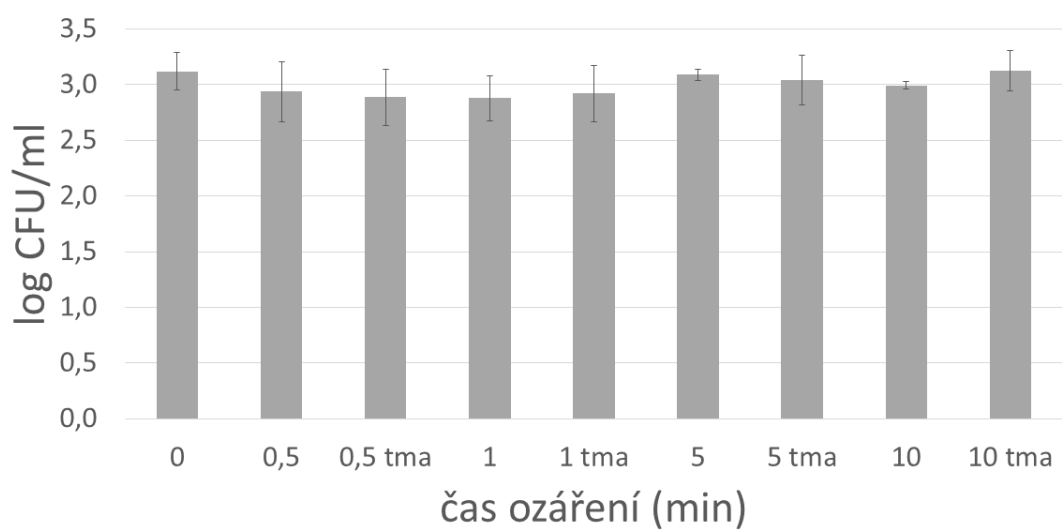
13.2. Fotodynamický efekt TPP-NPs vůči bakteriálním kmenům meticilin rezistentní *S. aureus*, *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy, *P. aeruginosa* a *E. faecalis*

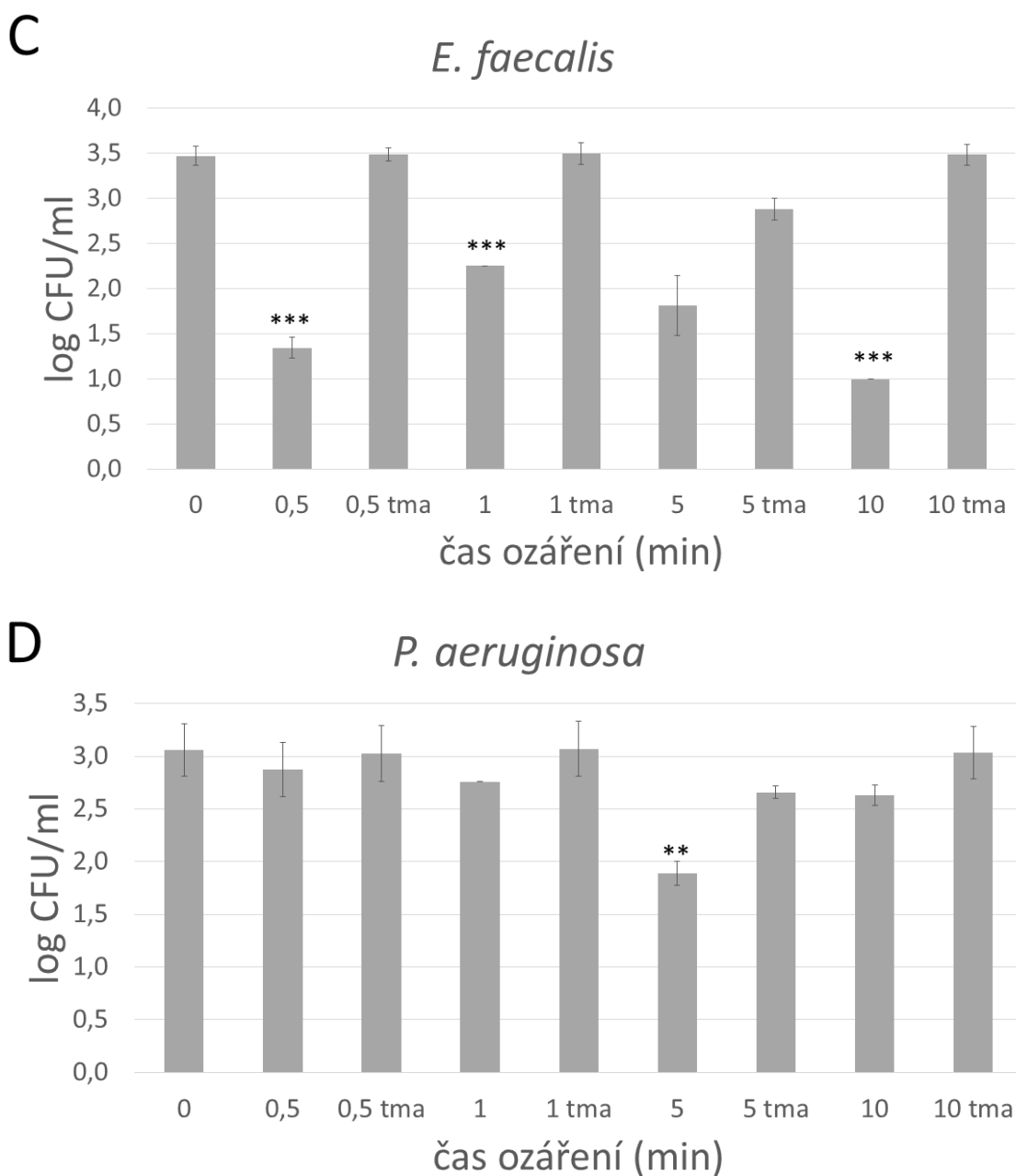
Cytotoxicita polystyrenových nanočástic s/bez navázaným fotosensitizerem TPP byla stanovena měřením počtu narostlých kolonií (CFUs) při různých hustotách světelné energie na meticilin-rezistentním *S. aureus*, *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy, *P. aeruginosa* a *E. faecalis*. Výsledky fotoinaktivace bakterií (obr. 12 a 13) jsou vyobrazeny jako průměrné hodnoty log CFU/ml ozářených a neozářených vzorků ze tří nezávislých experimentů při pokojové teplotě. Při použití samotných NPs bez navázaného fotosensitizeru TPP nebyl pozorován žádný antimikrobiální efekt u studovaných bakteriálních kmenů. Stejně výsledky byly získány i v případě použití TPP-NPs bez ozáření.

V případě TPP-NPs byl antimikrobiální efekt větší se zvyšující se hustotou světelné energie. Zatímco při světelné expozici došlo k významné redukci Gram-pozitivních bakteriálních kmenů, téměř žádný antimikrobiální efekt nebyl pozorován u *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (Gram-negativní kmen) (obr. 13B). Předcházející studie potvrzují, že ESBL-KP je vysoce rezistentní bakteriální kmen (Lee *et al.*, 2006, Navon-Venezia *et al.*, 2017). Můžeme tedy říci, že Gram-pozitivní bakteriální kmeny jsou více citlivé k aPDI zprostředkované TPP-NPs než Gram-negativní bakteriální kmeny.



Obr. 12.: Světlem indukovaná antimikrobiální aktivita polystyrenových nanočástic ($1,5 \times 10^{12}$ NPs/ml) při různých hustotách energie. Disperze nanočástic (3×10^{12} NPs/ml) byla smíchána 1:1 s disperzí MRSA, ESBL-KP, ENTf a PSEA. Výsledky jsou uvedeny v průměrných poměrech logaritmu počtu kolonií na ml (log CFU/ml) pozorovaných na agarových plotnách pro ozářené a neozářené vzorky ze tří nezávislých testů při pokojové teplotě.

A*S. aureus***B***K. pneumoniae*

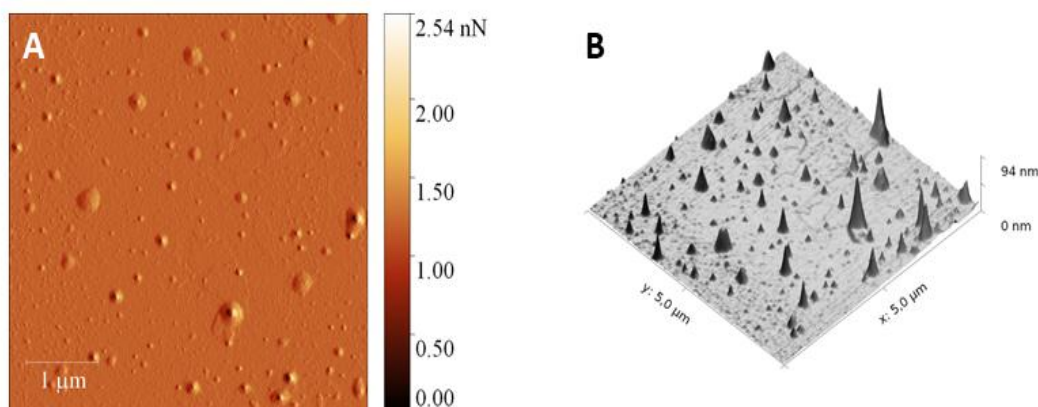


Obr. 13.: Fotoindukovaná antibakteriální aktivita TPP-NPs (1.5×10^{12} NPs/ml) při různých hustotách energie na MRSA-*S. aureus* (13A), ESBL-*K. pneumoniae* (13B), *E. faecalis* (13C) a *P. aeruginosa* (13D). Vzorok bakterii s TPP-NPs byly vystaveny různé světelné expozici – 0,5; 1; 5 a 10 minut, což koresponduje s hustotou energie - 1,62; 3,24; 16,2 a 32,4 J/cm². Výsledky jsou uvedeny v logaritmickeém měřítku počtu kolonií na ml (CFU/ml) pozorovaných na agarových plotnách pro ozářené a neozářené vzorky ze tří nezávislých testů při pokojové teplotě. Úroveň významnosti testu je označena hvězdičkami: * $p < 0,05$ (významný), ** $p < 0,01$ (velmi významný), *** $p < 0,001$ (extrémně významný).

Zjistili, jsme, že antimikrobiální fotodynamická inaktivace je vysoce účinná proti MRSA. Již po velmi krátké světelné expozici, 0,5 min ($1,62 \text{ J/cm}^2$), se počet kolonií snížil přibližně o 2 log CFU/ml v porovnání k temné kontrole (vzorky, které nebyly vystaveny světelné expozici). Stejné výsledky byly získány i pro ENTf. Naopak nebyla pozorována žádná významná redukce u Gram-negativních kmenů. Snížení počtu kolonií bylo pozorováno pro PSEA pouze po 5 minutové světelné expozici. Navíc, žádná významná redukce po 0,5 minutové světelné expozici nebyla zaznamenána u ESBL-KP.

13.3. Zobrazení TPP-NPs pomocí AFM

Morfologický povrch TPP-NPs byl zobrazen pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). 2D zobrazení a 3D zobrazení topografie TPP-NPs je vyobrazena na obr. 14.

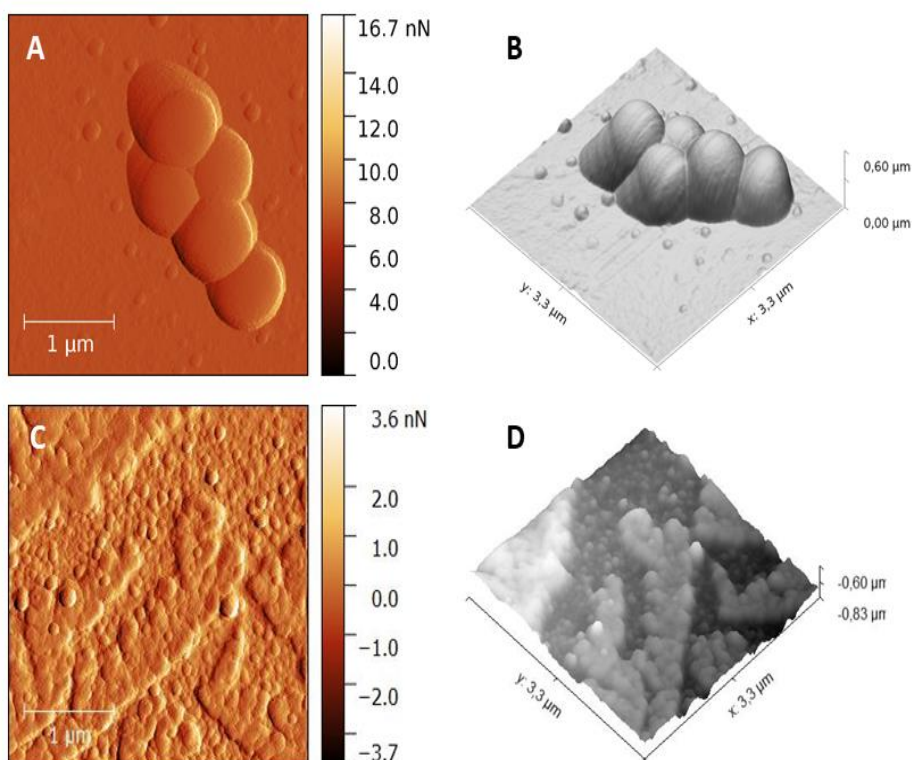


Obr. 14.: AFM 2D zobrazení topografie (A) a odpovídající obraz 3D rekonstrukce (B) TPP-NPs. Oblast skenování: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$). Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.

Skenování bylo provedeno v nekontaktním módu, skenovací oblast byla $3,3 \mu\text{m}$ a rychlost skenování byla 0,5 Hz. AFM obrázky byly následně zpracovány v programu Gwydion 2.40. Na obr. 14 můžeme vidět typický sférický tvar nanočástic s TPP s širokou distribucí jejich velikosti, průměrná hodnota velikosti těchto nanočástic byla $15 \pm 7 \text{ nm}$. Velikost nanočástic a distribuce jejich velikosti ve vodě byla stanovena dynamickým rozptylem světla (DLS) na Zetasizeru Nano ZS, Malvern. Z předchozí studie vyplývá, že přítomnost zapouzdřeného TPP ve všech použitých koncentracích nemá žádný vliv na morfologii nebo velikost nanočástic (Kubát *et al.*, 2017; Henke *et al.*, 2016).

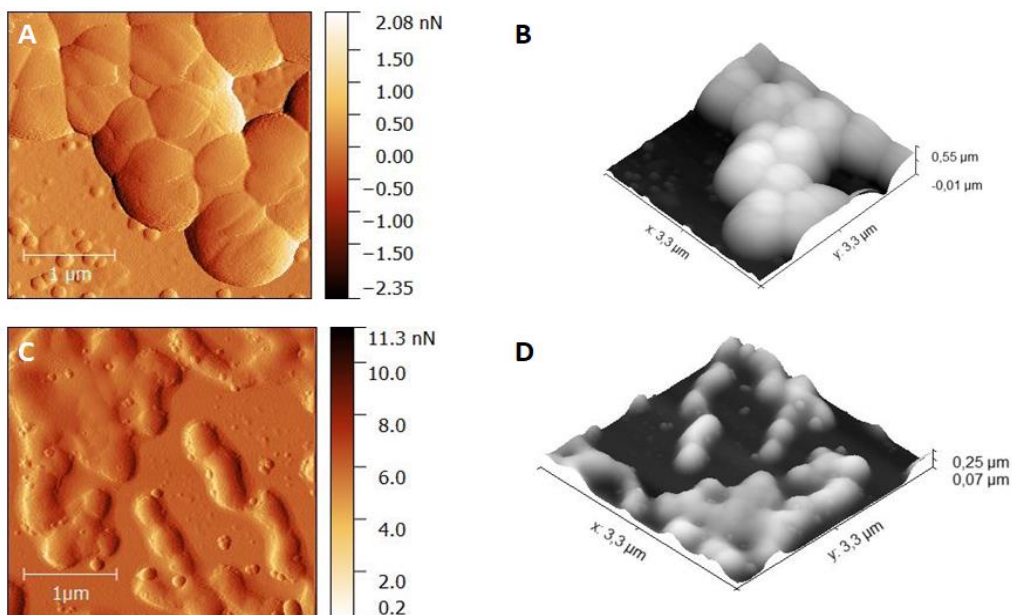
13.3.1. AFM snímky fotodynamicky ošetřených Gram-pozitivních bakteriálních kmenů (MRSA a ENTF)

AFM snímky meticilin-rezistentní *S. aureus* fotodynamicky ošetřeného a neošetřeného TPP-NPs před a po ozáření (1 min, odpovídající $3,24 \text{ J/cm}^2$), jsou zobrazeny na obr. 15 (2D zobrazení a odpovídající 3D zobrazení). Snímky neošetřených bakterií odhalily koky ve shlucích, což je typická morfologie *S. aureus* rezistentního na meticilin.



Obr. 15.: AFM 2D zobrazení topografie (levá strana) a odpovídající 3D rekonstrukce (pravá strana) meticilin-rezistentního *S. aureus* před terapií (A a B, skenovaná oblast: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$) a po terapii TPP-NPs s hustotou světelné energie $3,24 \text{ J/cm}^2$ (C a D, skenovaná oblast: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$). Obrázky byly zpracovány v programu Gwydion 2.40.

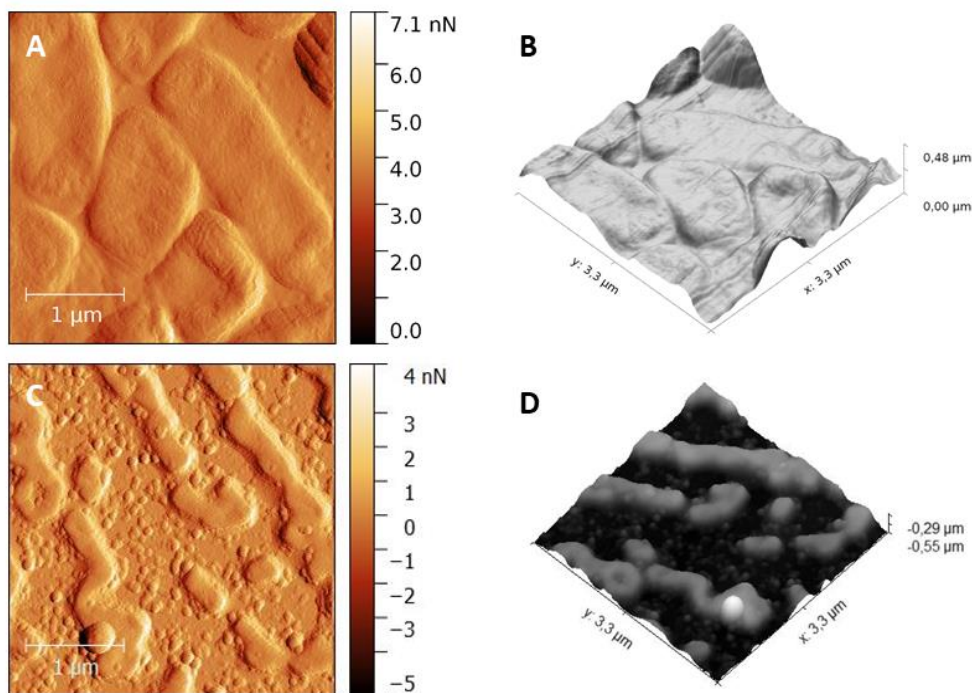
Střední výškový profil vyhodnocený AFM před terapií v programu Gwydion 2.40 byl $384,05 \text{ nm}$ a po terapii byl $193,86 \text{ nm}$. Naproti tomu morfologie ozářených buněk vykazovala významné rozdíly (obr. 15C a D). Povrch inaktivovaných buněk ($3,24 \text{ J/cm}^2$) byl zvrásněný, bakteriální buňky byly menší, jejich membrána byla rozrušena a buněčný obsah byl vylit do jejich okolí.



Obr. 16.: AFM 2D zobrazení topografie (levá strana) a odpovídající 3D rekonstrukce (pravá strana) *E. faecalis* před terapií (A a B, skenovaná oblast: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$) a po terapii s TPP-NPs s hustotou energie $3,24 \text{ J/cm}^2$ (C a D, skenovaná oblast: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$). Obrázky byly vyhodnoceny v programu Gwydion 2.40.

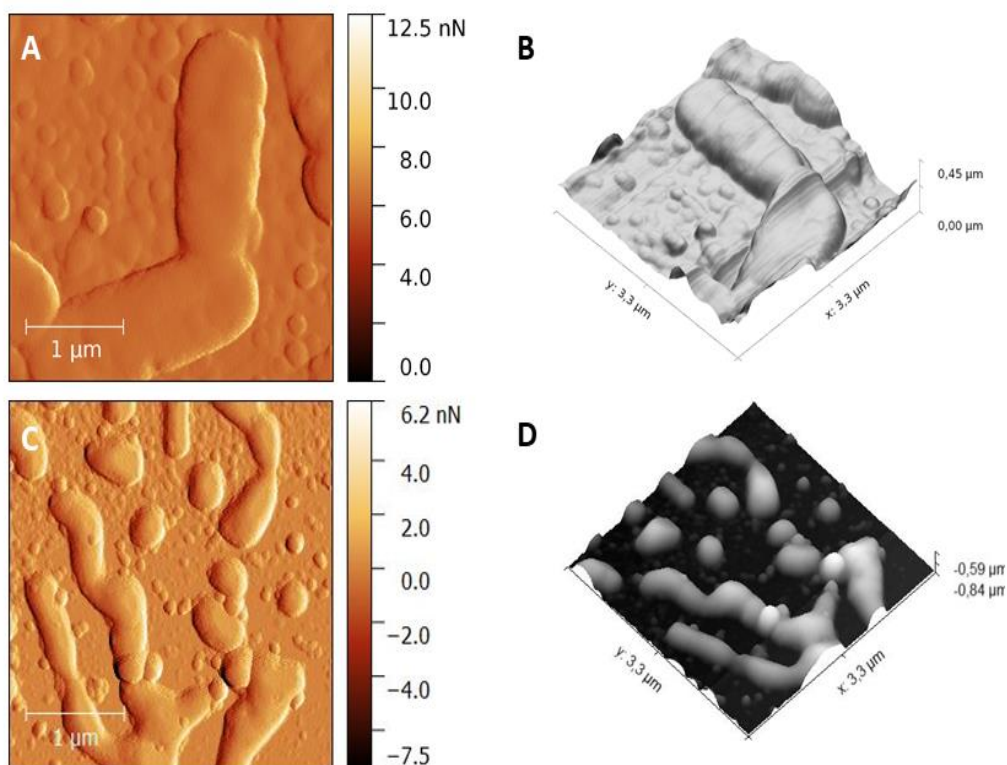
E. faecalis je Gram-pozitivní bakterie z rodu koků, která často roste v párech (diplokoky) nebo krátkých řetězcích (obr. 16A a B). Hodnota středního výškového profilu určená v programu Gwydion 2.40. byla 216,5 nm před terapií a 208,48 nm po terapii. Buňky malých rozměrů s rozrušenou buněčnou membránou a vylitým obsahem byly pozorovány po ošetření aPDI při $3,24 \text{ J/cm}^2$ (obr. 16C a D).

13.3.2. AFM snímky fotodynamicky ošetřených Gram-negativních bakteriálních kmenů (ESBL-KP a PSEA)



Obr. 17.: AFM 2D zobrazení topografie (levá strana) a odpovídající 3D rekonstrukce (pravá strana) *K. pneumoniae* produkující β -laktamázy před terapií (A a B, skenovaná oblast: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$) a po ošetření TPP-NPs a ozáření hustotu světelné energie $3,24 \text{ J/cm}^2$ (C a D, skenovaná oblast: $3,3 \mu\text{m} \times 3,3 \mu\text{m}$). Obrázky byly vyhodnoceny v programu Gwydion 2.40.

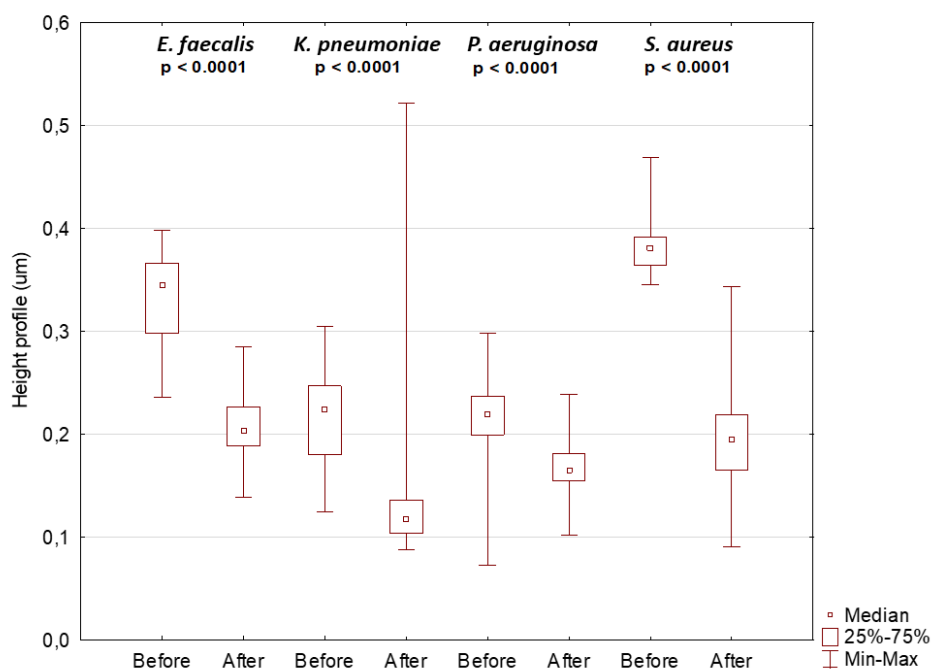
2D snímky a odpovídající 3D rekonstrukce AFM snímků *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy ošetřena TPP –NPs před a po ozáření je zobrazena na obr. 17. Zdravé buňky mají pravidelný oválný tvar s hladkým povrchem (obr. 17A a B). Střední výškový profil buněk určený programem Gwydion 2.40 byl 226,85 nm před a 136,65 nm po terapii. Buňky poškozené TPP-NPs zprostředkované aPDI mají na svém povrchu nepravidelné výstupky podobné bublinám (obr. 17C a D).



Obr. 18.: AFM 2D topografie (levá strana) a odpovídající 3D rekonstrukce (pravá strana) *P. aeruginosa* před ozářením (A a B, skenovaná oblast: 3,3 μm x 3,3 μm) a po ošetření TPP-NPs a ozáření hustotou světelné energie 3,24 J/cm² (C a D, skenovaná oblast: 3,3 μm x 3,3 μm). Obrázky byly vyhodnoceny v programu Gwydion 2.40.

P. aeruginosa je Gram-negativní bakterie ve tvaru tyčinky (obr. 18A a B) s vrstvou slizu, která může způsobovat choroby u rostlin a zvířat včetně lidí. Po ošetření TPP-NPs aktivovaných viditelným světlem byly pozorovány zmenšené bakterie. (obr. 18C a D). Střední výška pro *P. aeruginosa* před ošetřením byla 335,1 nm a po ošetření byla 169,69 nm, hodnocena programem Gwydion 2.40.

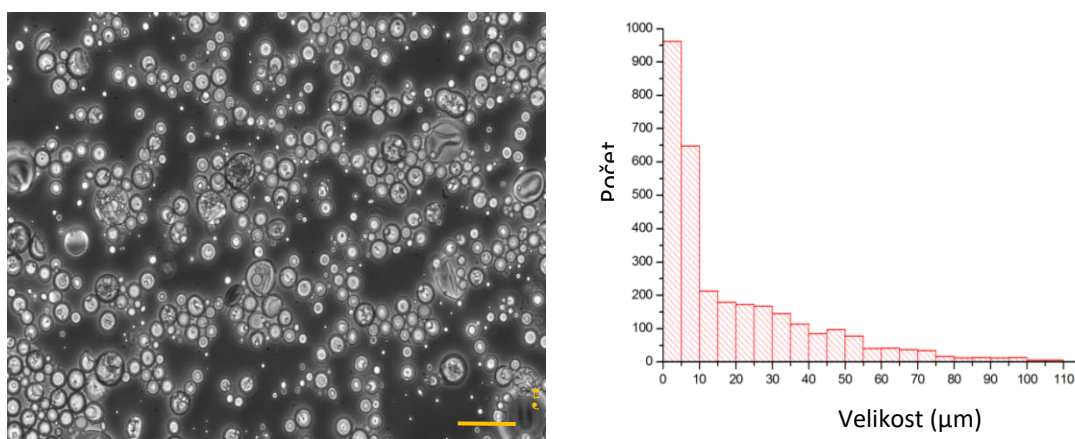
V této studii byly pomocí AFM detekovány výrazné rozdíly v topografiích Gram-negativních a Gram-pozitivních bakterií. Bylo analyzováno 50 buněk každého studovaného bakteriálního kmene před a po aPDI. Byl změřen výškový profil, jak ošetřených, tak neošetřených bakterií při hustotě světelné energie 3,24 J/cm². Po aplikaci aPDI bylo, u všech studovaných bakteriálních kmenů, pozorováno snížení výškového profilu bakterií. Mann-Whitneyův U-test ukázal, že hodnoty před ošetřením pro všechny bakterie byly statisticky významně vyšší než po ošetření, $p < 0,0001$ pro všechny bakterie (obr. 19).



Obr. 19.: *Statistická analýza výšky profilu všech studovaných bakteriálních kmenů. „Před“ představovaly neošetřené bakterie a „po“ představovaly bakterie vystavené TPP-NP s 3,24 J/cm². Mann-Whitneyův U-test ukázal, že hodnoty před ošetřením pro všechny bakterie byly statisticky významně vyšší než po ošetření, $p < 0,0001$ pro všechny bakterie.*

13.4. Charakteristika PLGA mikročastic

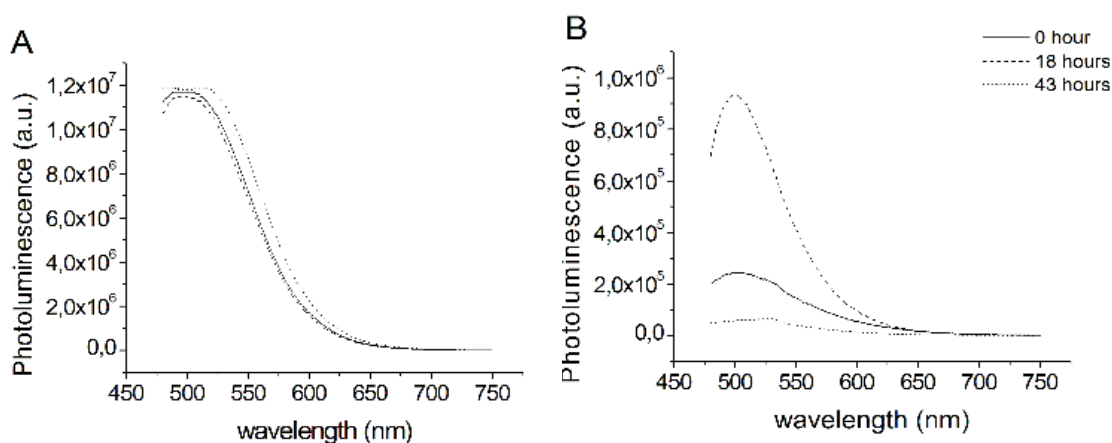
Připravené PLGA mikročastice byly charakterizovány pomocí optického mikroskopu (Leica micro systém, Německo) vybaveného digitální kamerou Leica DFC 295 (obr. 20). Mikročastice mají sférický a hladký povrch, na obr. 20 je zobrazena distribuce velikosti PLGA mikročastic, které jsou menší než 10 μm (obr. 20).



Obr. 20.: PLGA mikročastice zobrazené na optickém mikroskopu Leica a jejich distribuce velikosti, velikost je menší než 10 μm .

13.5. Kurkumín a jeho použití v aPDI

Jedním z největších problémů využití kurkumínu v aPDI je jeho rychlá degradace. Byla provedena spektrální analýza samotného kurkumínu a kurkumínu navázaného na PLGA mikročastice.

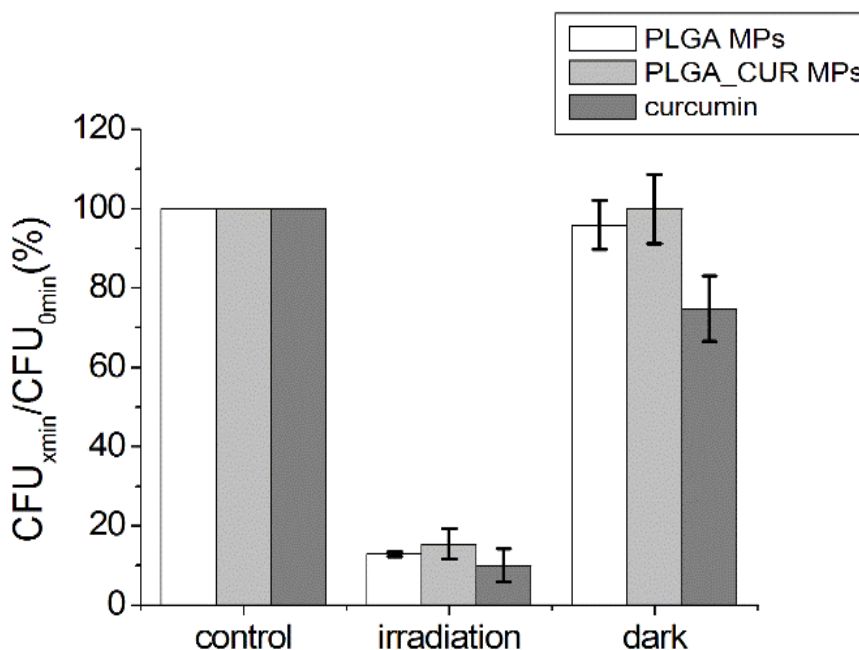


Obr. 21.: Spektrální analýza PLGA mikročastic s navázaným kurkumínem a kurkumínu. Spektra byla měřena pro tři různé dlouhé doby inkubace (0, 18 a 43 hod). A: PLGA mikročastice s kurkumínem (0,01 %), B: kurkumín (0,01 %).

Kurkumín byl rozpuštěn v DMSO (98 %) a poté byl tento roztok naředěn PBS pro získání koncentrace 3,9 μM , která odpovídá (0,01 %) koncentraci kurkumínu navázaného na mikročástice. Následně byla změřena fluorescenční spektra jak samotného kurkumínu (obr. 21A) tak kurkumínu navázaného na PLGA mikročástice (obr. 21B). Vzorky byly měřeny ve třech časech, a to ihned po přípravě, po 18 hodinách a po 43 hodinách.

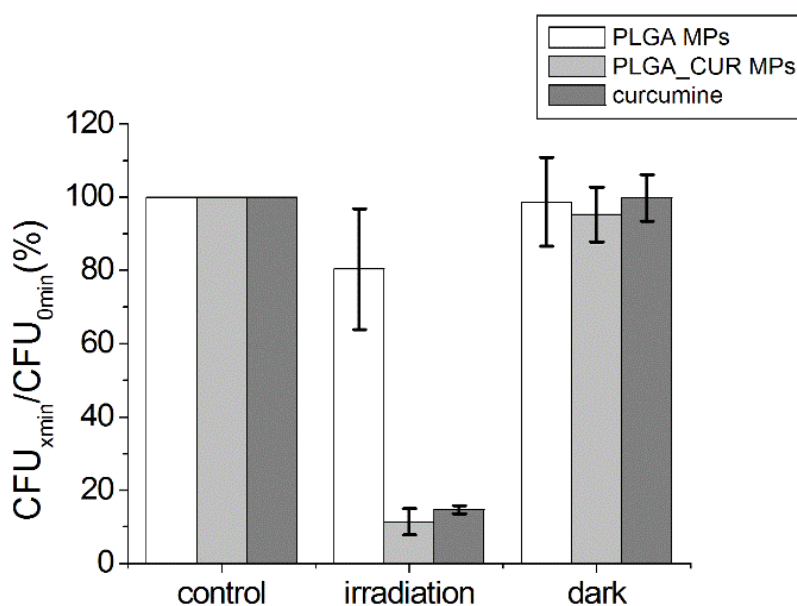
Z výsledků je zřejmé, že po 18 hod se absorpce samotného kurkumínu zvýšila, ale po 43 hodinách bylo zaznamenáno její prudké snížení (obr. 21B). Tyto výsledky ukazují na nestabilní chování kurkumínu. Tento problém je možné překonat právě navázáním kurkumínu na PLGA mikročástice. Stabilita navázaného kurkumínu byla ověřena opět spektrální analýzou, mikročástice s navázaným kurkumínem byly stabilní v čase, jejich fluorescenční spektra se nemění (obr. 21A).

Antimikrobiální vlastnosti PLGA mikročástic s navázaným kurkumínem byly hodnoceny pomocí metody počítání kolonií (CFU). Na bakteriálním kmenu *S. aureus* byly ověřovány různé koncentrace kurkumínu a kurkumínu navázaného na PLGA mikročástice.



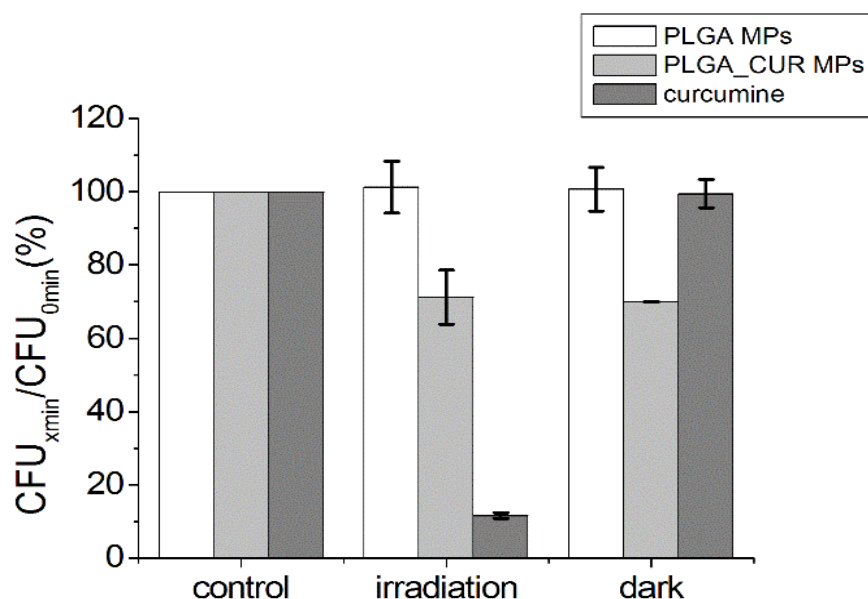
Obr. 22.: Cytotoxicita PLGA-CUR a kurkumínu při koncentraci 0,1 % na *S. aureus*. V grafu jsou zobrazeny hodnoty CFU po 24 hod po ozáření LED lampou (1 minuta). Jako kontrola byly použity neozářené vzorky. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ze třech nezávislých měření.

Studované koncentrace pro PLGA-CUR byly (0,1 %; 0,01 % a 0,005 %), pro kurkumín (6,5; 3,9; 1,4 μM), vzorky byly ozařovány po dobu 1 minuty LED lampou. Při koncentraci 0,1 %, (obr. 22) se počet bakteriálních kolonií po 24 hod inkubaci po ozáření snížil o 80 % CFU u všech vzorků. Nízký pokles počtu bakteriálních kolonií byl pozorován i u neozářeného kurkumínu, zde byl pokles o 20 % CFU. Pro koncentraci 0,01 % (obr. 23) bylo pozorováno snížení bakteriálních kolonií na 20 % vůči kontrole u vzorku PLGA-CUR a pro samotné PLGA mikročástice byl pokles CFU vůči kontrole na 80 % CFU.



Obr. 23.: Cytotoxicita PLGA-CUR a kurkumínu při koncentraci 0,01 % na *S. aureus*. V grafu jsou zobrazeny hodnoty CFU po 24 hod po ozáření LED lampou (1 minuta). Jako kontrola byly použity neozářené vzorky. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ze třech nezávislých měření.

Fototoxický efekt pro koncentraci 0,005 % (obr. 24) byl malý v porovnání s předchozími koncentracemi vzorku. Nebyl zaznamenán žádný rozdíl u ozářených a neozářených bakterií pro vzorek PLGA mikročástic s navázaným kurkumínem. Pro samotný kurkumín (1,4 μM) byl fototoxický efekt zřejmý, počet CFU byl pouze 15 % po ozáření.



Obr. 24.: Cytotoxicita PLGA-CUR a kurkumínu při koncentraci 0,005 % na *S. aureus*. V grafu jsou zobrazeny hodnoty CFU po 24 hod po ozáření LED lampou (1 minuta). Jako kontrola byly použity neozářené vzorky. Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ze třech nezávislých měření.

V této pilotní studii bylo zjištěno, že při nejvyšší studované koncentraci (0,1 %) PLGA mikročástic došlo po ozáření k redukci CFU na méně než 20 %. Při snížení koncentrace (0,01 %; 0,005 %) se neobjevila fototoxicita PLGA mikročástic. V případě samotného kurkumínu došlo k redukci bakteriálních kolonií u všech ověřovaných koncentrací. Jelikož je ale nenavázaný kurkumín v čase nestabilní, byl navázan na PLGA mikročástice. Takto upravené mikročástice byly studovány ve třech koncentracích a ze získaných výsledků se jako nejvhodnější koncentrace pro aplikaci aPDI jeví koncentrace 0,1 %.

14. Diskuze

Cílem práce bylo ověřit antimikrobiální účinnost fotodynamicky aktivních látek na bakteriálních kmenech meticilin-rezistentním *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy (ESBL), *P. aeruginose* a *E. faecalis* a dále stanovit optimální parametry antimikrobiální fotodynamické inaktivace na bakteriálních kmenech. Naším cílem bylo porovnat účinnost volných fotosensitizerů s účinností fotosensitizerů kombinovaných s dalšími antimikrobiálními látkami a s fotosensitizerem

zapouzdřenými/navázanými na různé typy nosičů. V disertační práci jsem se soustředila na studium viability bakterií a změnu morfologie buněk po aplikaci aPDI. K vyhodnocení účinnosti aPDI byla použita metoda počítání kolonií CFU, synergický efekt byl vyhodnocen modifikovanou mikrodilutační metodou.

Mikroskopie atomárních sil byla použita pro zobrazení topografie bakterií před terapií a po terapii. Prvním studovaným vzorkem byl porfyrinový fotosensitizer TMPyP kombinovaný s nanočásticemi stříbra. Dále jsou diskutovány výsledky nově vyvíjeného vzorku polystyrenových nanočástic s navázaným fotosensitizerem TPP. V závěru diskuze jsou rozebrány výsledky pilotní studie provedené s polymerními mikročásticemi, na kterých je navázán kurkumín. Diskuze je nejprve vedena obecně a poté je rozdělena do tří částí podle typu studovaných látek.

Rezistence bakteriálních kmenů k antibiotikům je velkým celosvětovým problémem, a proto je nutné vyvíjet nové, účinné a levné metody, jak se vyhnout bakteriálním onemocněním. Kromě několika známých fyzikálních (Farkas, 2007; Dobrynin *et al.*, 2009), chemických (Dillow *et al.*, 1999) a biologických (Ye *et al.*, 2019) metod používaných k inaktivaci bakterií je nejrozšířenější a nejčastěji používanou metodou antibiotická léčba. Ačkoliv bylo vyvinuto několik nových antibiotik, žádné z nich nezlepšilo účinnost proti multirezistentním bakteriálním kmenům (Mohanty *et al.*, 2012). Proto je důležité vyvíjet alternativní a účinné terapeutické strategie pro inaktivaci Gram-pozitivních a Gram-negativních patogenů. Jako jedno z řešení se ukazuje antimikrobiální fotodynamická inaktivace, případně její kombinace s dalšími antimikrobiálními látkami jako je například stříbro (Salomoni *et al.*, 2015).

Jak již bylo uvedeno, antimikrobiální fotodynamická inaktivace je jedním ze slibných a účinných léčebných nástrojů proti mikrobiálním infekcím, včetně těch způsobených rezistentními kmeny (Benov, 2015; Dai *et al.*, 2009). Mechanismus aPDI zahrnuje fotogeneraci vysoce cytotoxických reaktivních forem kyslíku a krátkými životnostmi, zejména singletového kyslíku $O_2(^1\Delta_g)$, prostřednictvím fotocitlivých reakcí. Stručně řečeno, stav tripletu fotosensitizeru je ukončen tripletem kyslíku a prostřednictvím přenosu energie je vytvořen $O_2(^1\Delta_g)$ s krátkou životností. Jedna molekula fotosensitizeru může produkovat mnoho $O_2(^1\Delta_g)$ před tím, než je zničena a díky této fotokatalytické aktivitě aPDI ničí mikroby rychleji i při mnohem nižší koncentraci

než biocidy a klinicky je aPDI jednoduše řízeno kontrolou dodávaného množství viditelného záření (Wainwright, 1998; Hamblin, 2016).

Dřívější *in vitro* studie ukázaly, že široké spektrum organismů zahrnující jak Gram-pozitivní bakterie jako je *S. aureus*, tak Gram-negativní bakteriální kmeny, jako je *K. pneumoniae*, jsou citlivé k aPDI při použití různých fotosensitizerů (Nakonieczna *et al.*, 2013). Několik dalších studií také potvrdilo, že fotosensitizery v kombinaci se světlem mohou inaktivovat různé typy bakterií včetně MRSA (Ahmadov *et al.*, 2016; Fiel *et al.*, 1981; Menezes *et al.*, 1990). Jori prokázal antimikrobiální účinek ozáření světlem v přítomnosti TMPyP na Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie (Jori, 2006).

Obecně platí, že účinnost fotodynamické terapie závisí na typu fotosensitizeru a bakteriálním kmenu. Aniontové fotosensitizery jsou efektivní vůči Gram-pozitivním kmenům více než proti Gram-negativním kmenům. Na druhou stranu, kationtové fotosensitizery mohou být efektivní u obou typů bakteriálních kmenů (Jori *et al.*, 2006). Tuto skutečnost vysvětluje schopnost fotosensitizeru vstupovat do buňky (Sperandio *et al.*, 2013). Reakce aniontového fotosensitizeru s bakteriálními buňkami může být zprostředkována proteinovými transportéry, zatímco vychytávání fotosensitizeru na bázi kationtů je zprostředkováno elektrostatickými interakcemi a samostatně podporovanými absorpčními cestami (George *et al.*, 2009).

Různá účinnost fotodynamické terapie na Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie může být způsobena tím, že Gram-negativní bakteriální kmeny mají více komplexní buněčnou stěnu (Silhavy *et al.*, 2010). Stěny jsou tvořeny vnější a vnitřní membránou oddělenou tenkou peptidoglykanovou vsrtvou, což představuje větší bariéru pro molekuly ve srovnání s bariérou Gram-pozitivních bakterií.

14.1. Synergický efekt TMPyP a AgNPs

Studiem nanočástic stříbra se již zabývala celá řada vědců a jejich výsledky potvrzují antimikrobiální vlastnosti těchto nanočástic (Li *et al.* 2011, Wysocka-Król *et al.*, 2018). Naše studie ukázala, že nanočástice stříbra v kombinaci s fotosensitizerem TMPyP viditelně inhibují růst rezistentních bakteriálních kmenů *S. aureus* MRSA a *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy ESBL-KP. Antimikrobiální

vlastnosti TMPyP a AgNPs jsou známé již dlouhou dobu, ale účinek jejich kombinace není prostudován.

Účinnost světlem aktivovaného TMPyP byla studována na Gram-pozitivních a Gram-negativních bakteriích, stejně tak na houbách např. *C. albicans*. Diogo a kol. demonstrovali, že TMPyP (0,1 mg/ml, i.e.cca 73 μ M) byl účinný v odstranění biofilmu *E. faecalis* a *C. albicans* při 90 s ozáření (Diogo *et al.*, 2017). Další práce ukázaly, že stačilo pouze 5 nebo 10 μ M TMPyP k vyvolání téměř úplné fotoinaktivace (snížení nejméně o 5 log₁₀) *C. albicans* (Diogo *et al.*, 2017, Quiroga *et al.*, 2010) respektive MRSA (Maisch *et al.*, 2012). Ale léčba Gram-negativní *E. coli* vyžadovala vyšší koncentraci TMPyP (100 μ M) a vyšší hustotu světelné energie použitého záření (40 J/cm²) (Quiroga *et al.*, 2010).

Stříbrné nanočástice byly používány po několik století díky jejich antibakteriálním vlastnostem, ale s objevem antibiotik jejich použití bylo významně sníženo (Politano *et al.*, 2013, Leaper, 2006). V současnosti se AgNPs opět začínají používat, především k léčbě antibioticky rezistentních bakteriálních kmenů. Navíc bylo zveřejněno, že při použití AgNPs v nízké koncentraci většinou nevykazovaly toxický efekt u lidí (Hussain *et al.*, 2005). Bylo nalezeno, že AgNPs v koncentraci menší než 1 mg/ml mají vysokou antimikrobiální aktivitu vůči *S. aureus* a *E. coli*, ačkoliv účinnost na Gram-pozitivních bakteriích byla vyšší než na Gram-negativních bakteriích (Rheima *et al.*, 2019, Soo-Hwan *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2011, Panáček *et al.*, 2018).

Několik vědců také studovalo antimikrobiální efekt kombinace fotosensitizeru s AgNPs. Wysocka-Król a kol. studovali antibakteriální efekt nanostříbrem modifikovaných částic oxidu křemičitého v kombinaci s komplexem chlorinu e6 (Photolon) na *P. aeruginosa* (Wysocka-Król *et al.*, 2018). Zjistili, že koncentrace PS může být v přítomnosti AgNPs snížena, ale antibakteriální účinek bude stejný jako v případě samostatné aplikace PS. Stejné výsledky pro tento bakteriální kmen byly získány v případě smíchání ftalocyaninu a zlatých nebo stříbrných nanočástic, které byly použity jako fotosenzitivní činidlo (Maliszewska *et al.*, 2018).

Naše výsledky jsou v souladu s těmito pracemi. Prokázali jsme, že aPDI zprostředkovaná pomocí TMPyP kombinovaného s AgNPs viditelně inhibuje bakteriální růst MRSA a ESBL-KP. V případě MRSA a nižší hustoty energie (10 J/cm²), minimální

inhibiční koncentrace TMPyP při 45 minutové inkubaci byla 100 μM , ale delší inkubace (5 hodin) snížila tuto hodnotu na polovinu. Lze tedy dojít k závěru, že delší inkubace TMPyP s bakteriemi vede k delší interakci TMPyP s buňkami, a tedy k větší účinnosti. Stejná závislost byla pozorována i pro ESBL-KP, až na to, že minimální inhibiční koncentrace TMPyP byla vyšší. Dalším důležitým parametrem byla hustota světelné energie použitého světla. Zvýšení hustoty světelné energie dvakrát na 20 J/cm^2 vedlo k významnému poklesu minimální inhibiční koncentrace pro oba studované bakteriální kmeny. Navíc jsme ukázali, že existuje synergický efekt mezi těmito dvěma látkami a jejich účinek je dokonce pozorován, i když léčba AgNPs následuje po aplikaci aPDI. Výpočet hodnoty $\text{FIC}_{\text{index}}$ ukazuje, že synergický efekt byl závislý na koncentraci fotosensitizeru TMPyP a hustoty energie. Pokles synergického účinku byl pozorován, když byla použita vyšší koncentrace TMPyP a/nebo vyšší hustota světelné energie (J/cm^2).

Výsledky této *in vitro* studie ukazují, že stříbrné nanočástice mají synergický antimikrobiální efekt s fotodynamicky aktivovaným TMPyP na MRSA a ESBL-KP. Tento postup může poskytnout další možnosti pro vývoj nových látek s antimikrobiálními vlastnostmi.

14.2. Fotodynamický efekt TPP-NPs vůči Gram-pozitivním a Gram-negativním bakteriálním kmenům, AFM vyhodnocení

V této části diskuze jsou rozebrány výsledky při vývoji a ověřování antimikrobiálních vlastností nově připravených stabilních polystyrenových nanočástic se zapouzdřeným fotosensitizerem TPP. Hlavním cílem této studie bylo ověřit antimikrobiální vlastnosti TPP-NPs vůči dvěma Gram-negativním bakteriálním kmenům a to meticilin-rezistentnímu *S. aureus* a *E. faecalis* a dvěma Gram-negativním bakteriím *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy a *P. aeruginosa*. Získané výsledky byly hodnoceny pomocí metody počítání kolonií (CFU) a bakteriální kolonie byly také zobrazeny pomocí AFM.

Fotosensitizery, které jsou volné ve vodném prostředí, musí splňovat zvláštní kritéria pro vstup do bakteriální buňky, nebo jejich vstup musí být podporován látkami zvyšujícími permeabilitu, jako je EDTA. Fotocitlivé látky malých molekul (např. methylenová modř), stejně jako pozitivně nabitě látky, se jeví jako slibné pro aplikaci

aPDI, zejména v kombinaci s látkami, které zlepšují propustnost. Je však třeba poznamenat, že každý antimikrobiální mechanismus závislý na přítomnosti molekul uvnitř bakteriálních buněk je spojen s rizikem vyvolání rozvoje další rezistence (Pohl *et al.*, 2016). Nedávno bylo prokázáno, že fotosensitizéry mohou vykazovat silný fototoxický účinek i bez vstupu do buněk. A tuto fototoxicitu lze vysvětlit pouze poškozením buněčných stěn zevnějšku (Preuß *et al.*, 2013). Obecně se předpokládá, že fotosensitizéry vázané na nebo v podpůrné matici často působí tímto mechanismem (Nie *et al.*, 2019; Henke *et al.*, 2014). Tyto poznatky nás inspirovaly k vyvinutí stabilní disperze sulfonovaných polystyrénových nanočástic se zapouzdřeným fotosensitizérem TPP (TPP-NPs). Připravené TPP-NPs s monomerním TPP s vysokým kvantovým výtěžkem $O_2(^1\Delta_g)$ mají negativně nabitý povrch díky rozsáhlé sulfonaci, která zabraňuje agregaci ve vodném prostředí a umožňuje uvolňování a transport $O_2(^1\Delta_g)$ v těsné blízkosti k chemickým/biologickým cílům. Polystyrénové jádro je průhledné pro viditelné záření a má vysoký koeficient difúze kyslíku. Sulfonovaný charakter nejen zajišťuje stabilitu NPs, ale také napodobuje aniontové fotosenzibilizátory s omezujícími schopnostmi vstoupit do bakteriálních buněk, které často mají záporné náboje (Henke *et al.*, 2016).

V této studii jsme použili relativně malé NPs (15 ± 7 nm). Obecně platí, že malé NPs fotogenerují $O_2(^1\Delta_g)$ nebo další ROS, které exponují vyšší aPDI (Slavin *et al.*, 2017), což je způsobeno vyšším poměrem mezi povrchem a objemem u malých NPs v porovnání s velkými NPs. Z našich výsledků lze pozorovat účinnější fotogeneraci $O_2(^1\Delta_g)$ nebo jiných ROS, což zase inaktivuje základní biomolekuly, jako jsou DNA, proteiny a lipidy bakterií (Karakoti *et al.*, 2006). Podrobný antibakteriální mechanismus je složitý a zahrnuje rozpad buněčných stěn bakterií. Jednou z možností porušení buněčné stěny je vnější fotooxidace hlavně lipidů této stěny pomocí ROS z NPs. Navíc bylo prokázáno, že ROS působí také proti vestavěným antioxidačním mechanismům obrany buněčné stěny (Ramalingam *et al.*, 2016). Další mechanismus zahrnuje přímou interakci NPs s bakteriální buňkou, která může vést k poškození membrány, po kterém někdy následuje penetrace NPs do buňky. Některé studie ukazují, že adsorpce na buněčné stěně následované jejím rozpadem je základní mechanismus jejich toxicity (Slavin *et al.*, 2017). Vazba NP na buněčnou stěnu vede k její depolarizaci a stěna se stává propustnější. Nejprve je tedy zničena buněčná stěna, následovaná penetrací NP. Poté se tvoří ROS, které inhibují produkci ATP a replikaci DNA.

Jedním z hlavních cílů této studie bylo zjistit, zda je možné použít NPs generující $O_2(^1\Delta_g)$ při aplikaci PDI pro Gram-negativní a Gram-pozitivní (včetně multirezistentních) bakterií za mírných (neextrémních) podmínek s ohledem na čas, hustotu světelné energie použitého záření a relativně nízkou koncentraci bakterií. NP fotogenerující vysoce cytotoxické $O_2(^1\Delta_g)$ mají určité výhody, ale také omezení. Při vysoké koncentraci bakteriální suspenze, kdy bakterie leží téměř vedle sebe a tím tvoří štít a chrání ostatní bakterie před oxidačním/cytotoxickým účinkem $O_2(^1\Delta_g)$ s velmi krátkou životností a difúzní cestou. Se zvyšující se koncentrací bakterií tedy účinek aPDI klesá. Proto jsme v této studii použili relativně nízkou koncentraci bakterií, abychom viděli fotoinaktivaci bez tohoto „stínícího“ efektu.

Naše výsledky aPDI zprostředkované TPP-NPs zobrazené na obr. 11 ukazují vyšší inaktivaci Gram-pozitivních bakterií než Gram-negativních při koncentraci $1,5 \times 10^{12}$ NPs/ml. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozí studií, která ukazuje, že Gram-pozitivní bakterie jsou citlivější na aPDI (Jin *et al.*, 2010). Pozorovali jsme, že účinná inhibiční hustota světelné energie záření při koncentraci $1,5 \times 10^{12}$ NPs/ml na meticilin-rezistentní *S. aureus* a *E. faecalis* byla $1,62 \text{ J/cm}^2$, zatímco pro inhibici růstu *P. aeruginosa* bylo nutné účinnou inhibiční hustotou energie zvýšit desetkrát, tedy na $16,2 \text{ J/cm}^2$.

Buněčná stěna Gram-pozitivních bakterií je docela jednoduchá. Obsahuje velké množství peptidoglykanu a kyseliny teichoové a navíc Gram-pozitivní bakterie nemají vnější buněčnou membránu. Naopak, Gram-negativní bakterie mají složitější buněčnou stěnu. Stěny jsou složeny z vnější a vnitřní membrány, které jsou oddělené periplasmatickým prostorem s tenkou vrstvou peptidoglykanu. Vnější buněčná membrána je vytvořena ze dvou lipidových dvojvrstev obsahujících fosfolipidy, sacharidy a bílkoviny (Mai-Prochnow *et al.*, 2016, Baron, 1996).

Díky těmto rozdílům je k deaktivaci Gram-negativních bakterií ve srovnání s Gram-pozitivními bakteriemi zapotřebí vyšší hustota světelné energie použitého světla generující více $O_2(^1\Delta_g)$ (Hamblin *et Hasan*, 2004).

Naše výsledky ukazují, že TPP-NPs může poškodit jen citlivé Gram-negativní bakteriální kmeny, např. PSAE. Pro *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy nebyl pozorován žádný antimikrobiální účinek. *K. pneumoniae*, na rozdíl od ostatních

námi testovaných kmenů, je zapouzdřená. Pouzdro, lokalizované na vnější straně buněčné stěny, je složeno především z polysacharidů a proteinů a chrání buňku před toxickými látkami.

Mnoho autorů (Dahl *et al.*, 1989; Hamblin *et al.*, 2002; Ban *et al.*, 2006) uvádí, že Gram-pozitivní bakterie lze snadno fotoinaktivovat pomocí $O_2(^1\Delta_g)$, na druhou stranu buněčná stěna Gram-negativních kmenů působí jako účinná bariéra, která brání fotooxidaci a/nebo penetraci mnoha fotocitlivých barviv. Pomocí námi připravených záporně nabitých NPs generujících singletový kyslík jsme dosáhli podobných výsledků. MRSA je velmi citlivá na aPDI zprostředkovanou pomocí TPP-NPs, ale u *K. pneumoniae* produkující širokospektré β -laktamázy nebyl pozorován žádný efekt ani po dlouhodobé světelné expozici s vysokou hodnotou hustoty světelné energie (10 min, 32,4 J/cm²).

Morfologické změny mezi Gram-pozitivními a Gram-negativními bakteriálními kmeny byly odlišné. U Gram-pozitivních bakteriálních kmenů byly pozorovány podobné morfologické změny. Všechny buňky vykazovaly zmenšení velikosti. Jejich povrchy měly porušené membrány. U všech Gram-negativních bakterií jsme pozorovali zmenšení buněk. Bakterie vykazovaly na svých površích nepravidelné výčnělky podobné bublinám. U PSEA byl zjištěn odlišný stupeň morfologického poškození, některé buňky měly narušenou membránu a unikl jejich obsah. U *K. pneumoniae* produkujících ESBL, byly pozorovány redukováné buňky ve srovnání s buňkami před PDI, ale nepozorovali jsme žádné poškození membrán a žádný uniklý buněčný obsah. To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že *K. pneumoniae* produkující ESBL patří mezi zapouzdřené bakteriální kmeny a aPDI zprostředkovaná TPP-NP proto není účinná při námi stanovených ozařovacích podmínkách.

Topografické změny indukované aPDI byly pozorovány u hustoty světelné energie 3,24 J/cm², což způsobilo ekvivalentní fototoxicitu u obou typů bakterií, kromě *K. pneumoniae* ESBL. Výsledky AFM ukázaly, že aPDI zprostředkovaná pomocí TPP-NP indukovala změny na buněčném povrchu bakterií. Narušení buněčného povrchu naznačuje poškození a dezorganizaci buněčných stěn, což může být důsledkem destabilizace peptidoglykanové sítě a/nebo oxidačního poškození vyvolaného v membránových složkách (Katsui *et al.*, 1982, Pillet *et al.*, 2016).

Morfologická data AFM naznačují, že hlavním cílem $O_2(^1\Delta_g)$ indukovaným ozářením TPP-NP je buněčný obal. AFM lze použít jako silný a citlivý nástroj k hodnocení účinnosti antibakteriálních látek a k prozkoumání mechanismu podávání léků (Sahu *et al.*, 2009). V této studii byla mikroskopie atomárních sil použita jako citlivý a rychlý vizuální nástroj pro studium interakcí mezi bakteriemi a singletovými kyslíkovými generátory NPs.

14.3. PLGA nanočástice

Poslední část práce byla věnována pilotní studii antimikrobiální fotodynamické inaktivace *S. aureus* zprostředkovaná PLGA mikročásticemi s navázaným kurkumínem. Polymerní nanočástice se v poslední době často používají jako nosiče fotosensitizeru (Pagonis *et al.*, 2009). Kyselina poly-mléčná a glykolová (PLGA) se často používá v biomedicině díky svým výhodám v oblasti buněčného nahrazování či terapii, a to zejména díky rychlé degradaci polymeru, jeho biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti. Díky výše uvedeným vlastnostem byl polymer PLGA schválen FDA pro klinické aplikace. Tyto systémy jsou schopné zacílit na různé orgány a řídit uvolňování molekul fotosensitizeru do specifických míst (Pagonis *et al.*, 2009).

Kurkumín má sám o sobě mnoho vlastností ideálního fotosensitizeru. Je velmi malý (368,38 g/mol), má schopnost vytvářet singletový kyslík a vyznačuje se vynikající biokompatibilitou (Gupta *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2013). Ribeiro a kol. se také zabývali studiem aPDI s kurkumínem a potvrdili jeho účinnost na MRSA (Ribeiro *et al.*, 2013).

Před samotnou aPDI aplikací jsme studovali stabilitu připravených PLGA mikročástic s navázaným kurkumínem pomocí fluorescenční spektroskopie. Kurkumín má velmi lipofilní charakter a je v čase nestabilní, po 43 hodinách byly molekuly kurkumínu degradovány a jeho použití v aPDI je tím pádem komplikované. Z tohoto důvodu byl kurkumín navázán na PLGA mikročástice, které zajistili jeho stabilizaci a ochránili jej před degradací v čase.

Citlivost *S. aureus* na aPDI zprostředkovaná mikročásticemi PLGA-CUR byla hodnocena vyočkováním ošetřených bakterií na agarové plotny a následným odečítáním počtu narostlých kolonií. Senzibilizace *S. aureus* mikročásticemi, po které následovalo

ozáření viditelným světlem po dobu 1 minuty, vedlo k usmrcení bakterií. Minimální koncentrace PLGA-CUR mikročástic pro úspěšnou aPDI *S. aureus* byla v této studii 0,005%, respektive 1,4 μM kurkumínu. Naše výsledky jsou v souladu s výzkumem Haukvik a kol., kde bylo použito 2,5 μM kurkumínu s 5% DMSO, 0,014% Tritonu X-100 nebo s 0,3% Pluronic L35 jako látky zvyšující rozpustnost k indukci více než 3 log₁₀ redukce Gram-pozitivních bakteriálních kmenů - *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus intermedius* (Haukvik *et al.*, 2009).

15. Závěr

Tato disertační práce je věnována studiu antimikrobiální fotodynamické inaktivace fotodynamicky aktivních látek a AgNPs na vybraných Gram-pozitivních (MRSA, ENTFF) a Gram-negativních (ESBL, PSEA) bakteriálních kmenech. U všech těchto bakteriálních kmenů byla pozorována účinnost jednotlivých ověřovaných látek při různých intenzitách záření. Byly porovnány výhody a nevýhody studovaných fotosensitizerů.

Rozdíly v účinnosti mezi Gram-pozitivními a Gram-negativními kmeny jsou způsobeny strukturálními rozdíly jejich buněčných stěn (Jori *et al.*, 2004). Buněčná stěna Gram-pozitivních bakterií obsahuje velké množství teichoové kyseliny a nemá vnější membránu. Naopak buněčná stěna Gram-negativních bakteriálních kmenů je zvlněná a má vnější buněčnou membránu se dvěma lipidovými dvojvrstvami (Mai-Prochnow *et al.*, 2016; Baron, 1996). Díky těmto rozdílům je pro inaktivaci Gram-negativních bakterií vyžadována vyšší intenzita ozáření, která generuje více singletního kyslíku (Hamblin *et Hasan*, 2004).

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že aPDI se jeví jako vhodná alternativa k běžně používané antibiotické léčbě. Vždy ale záleží na konkrétní aplikaci, daném bakteriálním kmenu, koncentraci použitého fotosensitizeru a použité plošné hustotě světelné energie.

Seznam použité literatury

1. Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(8):765-771.
2. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC and Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer Journal for Clinicians.* 2011; 61(4):250-281.
3. Ahmadov TO, Ding R, Zhang J, Wang P, Tang H and Zhang P. Silver nanoparticle-enhanced hybrid photosensitizer for photoinactivation of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *RSC Adv.* 2016; 6:54318–54321.
4. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJ and Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1(1):27-42.
5. Alves F, Alonso GC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Pavarina AC. Antimicrobial Photodynamic Therapy mediated by Photodithazine[®] in the treatment of denture stomatitis: A case report. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2018; 21:168-171.
6. Ban S, Caruso E, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, Orlandi V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2006; 85(1):28–38.
7. Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, Lorente C, Nunez SC, Ribeiro MS, Thomas AH, Vignoni M, Yoshimura TM. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol.* 2017; 93(4):912-919.

8. Barabaszová ČK. Mikroskopické metody analýzy materiálů a nanomateriálů-praktická část. In: Praktické příklady analýzy materiálů a nanomateriálů. Ostrava: Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, 2014; 6-16.
9. Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. ISBN-10:0-9631172-1-1.
10. Bazylińska U, Frąckowiak R, Brzózka Z, Wilk KA. The effect of anionic dicephalic surfactants on fabrication of varied-core nanocarriers for sustained release of porphyrin photosensitizers. *J Photochem Photobiol B*. 2017; 166:169-179.
11. Bednář M. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996; 558 s. ISBN-10:80-2380-297-6.
12. Beneš J. Infekční lékařství. 1. vydání. Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
13. Benov L. Photodynamic Therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract*. 2015; 24:14-28.
14. Bisland SK, Lilge L, Lin A, Rusnov R, Wilson BC. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol*. 2004; 80:22–30.
15. Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2002; 17(3):173-186.
16. Buytaer E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1776(1):86-107.

17. Cahan R, Swissa N, Gellerman G, Nitzan Y. Photosensitizer–Antibiotic Conjugates: A Novel Class of Antibacterial Molecules. *Photochemistry and Photobiology*. 2010; 86(2):418–425.
18. Castano A, Mroz P, Wu M, Hamblin M. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(14):5495-500.
19. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004; 1(4):279-293.
20. Čechová L, Janalíková M. *Obecná mikrobiologie*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. 1. vydání, 2007. 190s. ISBN 9788073185169 8073185164.
21. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol*. 2018; 44(5):571-589.
22. Clark C, Bryden A, Dawe R, Moseley H, Ferguson H, Ibbotson SH. Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003;19(3):134–141.
23. Cleveland D, Long SE, Pennington PL, Cooper E, Fulton MH, Scott GI, Brewer T, Davis J, Petersen EJ, Wood L. Pilot estuarine mesocosm study on the environmental fate of silver nanomaterials leached from consumer products. *Science of the Total Environment*, 2012; 421:267-272.

24. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bacteriol.* 1989; 171(4):2188–2194.
25. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections—state of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2009; 6(3-4):170–188.
26. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release* 2012; 161(2):505-522.
27. De Rosa FS, Bentley MV. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm Res.* 2000; 17(12):1447-1455.
28. Degterev A, Huang ZH, Boyce M, Li YQ, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005; 1(2):112-9.
29. Dillow AK, Dehghani F, Hrkach JS, Foster NR, Langer R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(18):10344-10348.
30. Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J. Phys.* 2009; 11:115020.
31. Dohnalová L, Dohnal V. Nanočástice a jejich toxicita. *Chem. Listy.* 2015; 109(6): 444-450.

32. Dolanský J, Henke P, Malá Z, Žárská L, Kubát P, Mosinger J. Antibacterial nitric oxide- and singlet oxygen-releasing polystyrene nanoparticles responsive to light and temperature triggers. *Nanoscale*. 2018; 10:2639-2648.
33. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbely M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 17,90(12):889-905.
34. Dumoulin F. Presentation of the different types and generations of photosensitizers. *Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security*. Springer Netherlands, 2012; 664s. ISBN 9401783314.
35. Eaton P, West P. Atomic force microscopy. Oxford University Press. Oxford. 2010. ISBN 9780199570454.
36. Ethirajan A, Schoeller K, Musyanovych A, Ziener U, Landfester K. Synthesis and optimization of gelatin nanoparticles using the miniemulsion process. *Biomacromolecules*. 2008; 9(9):2383-2389.
37. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017. ISBN 978-92-9498-029-8.
38. Farkas J. Physical Methods of Food Preservation. In Doyle M, Beuchat L (ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Third Edition. ASM Press. Washington DC. 2007; 685-712. ISBN 9781555814076.
39. Fiel RJ, Datta-Gupta N, Mark EH, Howard JC. Induction of DNA Damage by Porphyrin Photosensitizers. *Cancer Res*. 1981; 41:3543-3545.
40. Fingar VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*. 1996; 14(5):323-328.

41. Gaczynska M, Osmulski PA. AFM of biological complexes: What can we learn? *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2008; 13(5):351-367.
42. George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2009; 8(6):788–795.
43. Ghuysen JM, Hakenbeck R. *Bacterial cell wall.* Elsevier Science B. V. 1. vydání 1994. 580s. ISBN 9780444880949.
44. Green DW. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2002; 6(1):1-19.
45. Grillo R, Rosa AH, Fraceto LF. Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art. *Chemosphere.* 2015;119:608-619.
46. Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S, Aggarwal BB. Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57(9):1510-28.
47. Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *BioFactors,* 2013; 39(1):2–13.
48. Gupta SC, Patchva S *et* Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2013; 15:195–218.
49. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004; 3(5):436–450.
50. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 33:67-73.

51. Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: Effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 49(6):941–951.
52. Hanaková A, Bogdanová K, Tomanková K, Pížová K, Malohlava J, Binder S, Bajgar R, Langová K, Kolář M, Mosinger J, Kolářová H. Fototoxický vliv porfyrinových sensitizérů a viditelného záření na gram-pozitivní meticilin-rezistentní kmen *S. aureus*, *Lékař a technika - Clinician and Technology.* 2013; 19-23.
53. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences,* 2009; 64:666–673(8).
54. Henderson BW, Fingar VH. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.* 1987; 47(12):3110-3114.
55. Henke P, Kirakci K, Kubát P, Fraiberk M, Forstová J, Mosinger J. Antibacterial, Antiviral and Oxygen-Sensing Nanoparticles Prepared from Electrospun Materials. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016; 8:25127-25136.
56. Henke P, Kozak H, Artemenko A, Kubát P, Forstová J, Mosinger J. Superhydrophilic Polystyrene Nanofiber Materials Generating $O_2(^1\Delta_g)$: Postprocessing Surface Modifications toward Efficient Antibacterial Effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014; 6:13007-13014.
57. Holley DW, Ruppel M, Mays JW, Urban VS, Baskaran D. Polystyrene nanoparticles with tunable interfaces and softness. *Polymer* 2014; 55:58–65.

58. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, Barqawi AB, Chen YK. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol Cancer Res Treat.* 2008; 7(4):309-20.
59. Huang Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 2005; 4(3):283-93.
60. Huang Z. Photodynamic therapy in China: Over 25 years of unique clinical experience Part One - History and domestic photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2006; 3(1):3-10.
61. Humagain S. Differences between Gram positive and Gram negative bacteria. *Online science notes.* 2018. Dostupné z: <https://onlinesciencenotes.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/> (online, 2021).
62. Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2004. ISBN-10: 1555810381.
63. Jalili N, Laxminarayana K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics.* 2004; 14(8):907-945.
64. Jandt KD. Atomic force Microscopy of Biomaterials Surfaces and Interfaces. *Surface Science.* 2001; 491(3):303-332.
65. Jesionek A, von Tappeiner H. Zur behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden stoffen. *Arch Klin Med* 1905; 82:223-7.
66. Jin H, Huang X, Chen Y, Zhao H, Ye H, Huang F, Xing X, Cai J. Photoinactivation effects of hematoporphyrin monomethyl ether on Gram-positive and -negative

- bacteria detected by atomic force microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 88:761-770.
67. Jiravová J, Tománková Bartoň K, Harvanová M, Malina L, Malohlava J, Luhová L, Panáček A, Manišová B, Kolářová H. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells *in vitro*. *Food chem Toxicol*. 2016; 96:50-61.
 68. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G. Photodynamic Therapy in the Treatment of Microbial Infections: Basic Principles and Perspective Applications. *Lasers Surg Med*. 2006; 38(5):468-81.
 69. Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25(1-2):505–19.
 70. Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(3):148-54.
 71. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Odenholt I, Rodloff A, Soussy CJ, Steinbakk M, Soriano F, Stetsiouk O. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(6):501–503.
 72. Kaprálek F. *Základy bakteriologie*. Univerzita Karlova v Praze – vydavatelství Karolinum. 2000. ISBN 80-7184-811-5.
 73. Karakoti AS, Hench LL, Seal, S. The potential toxicity of nanomaterials—The role of surfaces. *JOM*. 2006; 58:77–82.

74. Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, Joh T. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med.* 2017; 5(8):183.
75. Katsui N, Tsuchido T, Hiramatsu R, Fujikawa S, Takano M, Shibasaki I. Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1982; 151:1523–1531.
76. Kessel D, Oleinick NL. Initiation of Autophagy by Photodynamic Therapy. *Methods Enzymol.* 2009; 453:1-16.
77. Kessel D, Vicente MG, Reiners JJ Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5):482-488.
78. Krishnadath KK, Wang KK, Taniguchi K, Sebo TJ, Buttar NS, Anderson MA, Lutzke LS, Liu W. Persistent genetic abnormalities in Barrett's esophagus after photodynamic therapy. *Gastroenterology.* 2000; 119(3):624-30.
79. Kubát P, Henke P, Berzédiová V, Štěpánek M, Lang K, Mosinger J. Nanoparticles with Embedded Porphyrin Photosensitizers for Photooxidation Reactions and Continuous Oxygen Sensing, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017; 9:36229-36238.
80. Kubínek R, Vůjtek M, Holubová R. Mikroskopie atomárních sil. *Matematika, fyzika, informatika*, 2001; 9(10):536-546.
81. Kubínek R, Vůjtek M, Mašláň M. Mikroskopie skenující sondou. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 2003. ISBN: 80-244-0602-0.
82. Kübler AC. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application.* 2005; 20(1):37-45.

83. Kudinova NV, Berezov TT. Photodynamic therapy of cancer: Search for ideal photosensitizer. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010; 4(1):95–103.
84. Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI: Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007; 38(8):824-833.
85. Kvítek L. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF UP Olomouc. 2006
86. Lamch L, Bazylińska U, Kulbacka J, Pietkiewicz J, Biežuńska-Kusiak K, Wilk KA. Polymeric micelles for enhanced Photofrin II[®] delivery, cytotoxicity and pro-apoptotic activity in human breast and ovarian cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014; 11(4):570-85.
87. Lang K, Mosinger J, Wagnerová DM. Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva. *Chem. Listy*. 2006; 100:169–177.
88. Laurent C, Flahaut E, Peigney A. The weight and density of carbon nanotubes versus the number of walls and diameter. *Carbon*, 2010; 48(10):2994-2996.
89. Lee Ch H, Su L H, Tang Y F, Liu J W. Treatment of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates. *J. Antimicrob Chemoth*. 2006; 58:1074–1077.
90. Li WR, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen YB. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*. 2011; 24(1):135-41.
91. Loos C, Syrovets T, Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Nienhaus GU, Simmet T: Beilstein Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio–nano interactions *J. Nanotechnol*. 2014; 5:2403–2412.

92. Lyons M, Phang I, Eljamel S. The effects of PDT in primary malignant brain tumours could be improved by intraoperative radiotherapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9(1):40-5.
93. Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy A B. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci. Rep.* 2016; 6:38610.
94. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM and Bäuml W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(17):7223-7228.
95. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels CH. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(10):907-17.
96. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganism: antimicrobial photodynamic treatment. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9(8):974-983.
97. Maisch T, Shimizu T, Li YF, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, Zimmermann JL. Decolonization of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by Cold-Atmospheric Plasma Using a Porcine Skin Model *In Vitro*. *Plos one.* 2012; 7(4).
98. Malá Z, Žárská L, Malina L, Langová K, Večeřová R, Kolář M, Henke P, Mosinger J, Kolářová H. Photodynamic effect of TPP encapsulated in polystyrene nanoparticles toward multi-resistant pathogenic bacterial strains: AFM evaluation. *Sci Rep.* 2021; 11(6786).
99. Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2004; 1(1):43-48.

100. Mansha M, Khan I, Ullah N, Qurashi A. Synthesis, characterization and visible-light-driven photoelectrochemical hydrogen evolution reaction of carbazole-containing conjugated polymers. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017; 42(16):10952-10961.
101. Marambio-Jones C, Hoek EM. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*. 2010; 12(5):1531-1551.
102. Marijnissen JPA, Baas P, Beek JF, van Moll JH, van Zandwijk N, Star WM. Pilot study on light dosimetry for endobronchial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1993; 58(1):92–9.
103. Masopust J, Průša R, Goetz P, Pelouch V, Zima T, Jirásek JE, Štern P, Jabor A, Mareš, Bartůňková J, Palička V. *Patobiochemie buňky*. Vydala Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta. 1. vydání. 2003. ISBN: 80-239-1011-0.
104. Menezes S, Capella MAM, Caldas LR. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in *Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*. 1990; 5:505-517.
105. Mohanty S, Mishra S, Jena P, Jacob B, Sarkar B, Sonawane A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2012; 8:916–924.
106. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin, MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 2011; 3(2):2516–2539.
107. Nakonieczna J, Rapacka-Zdonczyk A, Kawiak A, Bielawska KP, Grinholc M. Sub-lethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible to silver nanoparticles. *Photochem Photobiol Sci*. 2013; 12:1622–1627.

108. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41:252–275.
109. Nie X, Wu S, Mensah A, Lu K, Wei Q. Carbon quantum dots embedded electrospun nanofibers for efficient antibacterial photodynamic inactivation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 108:110377.
110. Nováková T, Šváb M, Švábová M. Využití nanočástic v dekontaminačních technologiích: současný stav. *Chem. Listy.* 2009; 103(7):524-532.
111. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2009; 85(5):1053-74.
112. Ormond AB and Freeman HS. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials (Basel).* 2013; 6(3):817-40.
113. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, Foschi F, Dunham J, Skobe Z, Yamazaki H, Kent R, Tanner AC, Amiji MM, Soukos NS. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod.* 2009; 36(2):322-8.
114. Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolář M, Večeřová R, Pizúrová N, Sharma VK, Nevěčná T, Zbořil R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J Phys Chem B.* 2006; 110(33):16248-53.
115. Panáček A, Smékalová M, Kilianová M, Pucek R, Bogdanová K, Večeřová R, Kolář M, Havrdová M, Płaza GA, Chojniak J, Zbořil R, Kvítek L. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules.* 2015; 21(1):E26.

116. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, Večeřová R, Kolář M, Röderová M, Dyčka F, Šebela M, Pucek R, Tomanec O, Zbořil R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat. Nanotechnol.* 2018; 13:65–71.
117. Pervaiz S, Olivo M: Art and science of photodynamic therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(5-6):551-6.
118. Pillet F, Formosa-Dague C, Baaziz H, Dague E, Rols M P. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Sci Rep.* 2016; 6:19778.
119. Plaetzer K, Kiesslich T, Verwanger T, Krammer B. The modes of cell death induced by PDT: An Overview. *Medical Laser Application.* 2003; 18(1):7-19.
120. Pohl J, Preuß A, Röder B. Photodynamic inactivation of microorganisms S. Nonell, C. Flors (Eds.), In: *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, Royal Soc Chemistry. 2016; 2:305-318.
121. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters.* 2012; 2(1):32.
122. Prado M, Lima LC, Simão RA. Scale laws for AFM image evaluation: potentialities and applications. In: *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology.* 2012; 1(2):923-929.
123. Preuß A, Zeugner L, Hackbarth S, Faustino M, Neves M, Cavaleiro J, Roeder B. Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *J Appl Microbiol* 2013; 114:36-43.

124. Procházková K, Zelinger Z, Lang K, Kubát P. Meso-tetratolylporphyrins substituted by pyridinium groups: aggregation, photophysical properties and complexation with DNA. *J Phys Org Chem* 2004; 17:890–897.
125. Qiang YG, Zhang XP, Li J, Huang Z. Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119(10):845-57.
126. Raab GH, Schneider AF, Eiermann W, Gottschalk-Deponte H, Baumgartner R, Beyer W. Response of human endometrium and ovarian carcinoma cell-lines to photodynamic therapy. *Arch Gynecol Obstet*. 1990; 248(1):13-20.
127. Ramalingam B, Parandhaman T, Das S K. Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016; 8:4963–76.
128. Reiners JJ Jr, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*. 2010; 6(1):7-18.
129. Ribeiro PA, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, Costa CA. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(2):391-398.
130. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2009; 96(1):1-8.
131. Robichon D, Girard JC, Cenatiempo Y, Cavellier JF. Atomic force microscopy of dried or living bacteria. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences- Series III – Sciences de la Vie*. 1999; 322:687–693.

132. Sahu K, Bansal H, Mukherjee Ch, Sharma M, Gupta P K. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of Toluidine Blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J Photoch Photobiol B. 2009; 96:9-16.
133. Salomoni R, Léo P, Rodrigues M. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (AgNPs) in *Staphylococcus aureus* and Cytotoxicity Effect in Mammalian Cells. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. 851-857, (Formatex 2015).
134. Sasnauskiene A, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V, Kirvelienu V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. Apoptosis. 2009; 14(3):276–286.
135. Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. Recent Pat. Antiinfect Drug Discov. 2013; 8(2):108-120.
136. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO J. 2007; 26(7):1749-1760.
137. Shah SK, Ost D. Photodynamic Therapy: a case series demonstrating its role in patients receiving mechanical ventilation. Chest. 2000; 118(5):1419-23.
138. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2(5):000414.
139. Slavin Y N, Asnis J, Häfeli U O, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. Journal of Nanobiotechnology. 2017; 15:65.

140. Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted Antimicrobial Photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(10):2595-2601.
141. Tománková K, Horáková J, Harvanová M, Malina L, Soukupová J, Hradilová Š, Kejlova K, Malohlava J, Licman L, Dvořáková M, Jírová D, Kolářová H. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro. *Food and chemical toxicology.* 2015; 82:106-115.
142. v. Tappeiner H. Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe) 1909; 8:698-741.
143. Večeřová R. Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita. *Klin Farmakol Farm.* 2016; 30(3):18-20.
144. Venier-Julienne MC, Vouldoukis J, Monjour L, Benoit JP. In vitro study of the anti-leishmanial activity of biodegradable nanoparticles. *J Drug Target.* 1995; 3(1):23–29.
145. Vera DM, Haynes MH, Ball AR, Dai DT, Astrakas C, Kelso MJ, Hamblin MR, Tegos GP. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(3):499-511.
146. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, Hamblin MR. Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(2):e49-e55.
147. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrobl Chemother.* 1998; 42(1):13–28.

148. Weersink R, White Roger, Lilge L. Light dosimetry for Low-Level Laser therapy: Accounting for differences in tissue and depth. *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. 2007;6428:2.
149. Wysocka-Król K, Olsztyn´ska-Janus S, Plesch G, Plecenik A, Podbielska H, Bauer J. Nano-silver modified silica particles in antibacterial photodynamic therapy. *Appl Surf Sci* 2018; 461:260-268.
150. https://www.wikiskripta.eu/w/Struktura_bakteri%C3%AD (online 2021)
151. Ye M, Sun M, Huang D, Zhang Z, Zhang H, Zhang S, Hu F, Jiang X, Jiao W. A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environ Int*. 2019; 129:488-496.
152. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 83:761–769.
153. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9):1534.
154. Zimčık P, Miletín M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění--II. Přehled fotosenzitizerů [Photodynamic therapy as a new prospective method for cancer treatment--II. Overview of photosensitizers]. *Ceska Slov Farm*. 2004; 53(6):271-279.

Publikační činnost autora

Původní vědecké publikace v časopise s IF

- Jiří Dolanský, Petr Henke, **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Pavel Kubát, Jiří Mosinger. Antibacterial Nitric Oxide- and Singlet Oxygen Releasing Polystyrene Nanoparticles: Light and Temperature Trigger. *Nanoscale*, 2018, 10, 2639-2648, **IF 7,367**
- Svatopluk Binder, Barbora Hošíková, **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Hana Kolářová. Combined Effect of CIAIPcS2 Photodynamic and Sonodynamic Therapy on HeLa cells. *Physiological Research*, 2019, **IF 1,7**
- **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Robert Bajgar, Kateřina Bogdanová, Milan Kolář, Aleš Panáček, Svatopluk Binder, Hana Kolářová. The application of antimicrobial photodynamic inactivation on methicillin-resistant *S. aureus* and ESBL-producing *K. pneumoniae* using porphyrin photosensitizer in combination with silver nanoparticles. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021, 33, **IF 2,894**
- Ludmila Žárská, **Zuzana Malá**, Kateřina Langová, Lukáš Malina, Svatopluk Binder, Robert Bajgar, Hana Kolářová. The Effect of Two Porphyrine Photosensitizers TMPyP and ZnTPPS4 for Application in Photodynamic Therapy of Cancer Cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2021, **IF 2,894**
- **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Lukáš Malina, Kateřina Langová, Renata Večeřová, Milan Kolář, Petr Henke, Jiří Mosinger, Hana Kolářová. Photodynamic effect of TPP encapsulated in polystyrene nanoparticles toward multi-resistant pathogenic bacterial strains: AFM evolution. *Scientific Reports*, 2021, **IF 3,998**

Původní vědecké publikace v časopise bez IF

- Martin Sněhota, Jaromír Vachutka, Ladislav Doležal, Hana Kolářová, **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská Analysis of ultrasound field parameters during sonication experiments *in vitro* – influence of laboratory glass and plastics. Lékař a technika, 2017

Publikace abstrakt ve sbornících

- **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Alessandra Galli, Carla Perego, Alberto Passi, Marta Galgano, Ilaria Giuntini, Massimo Costa, Cristina Lenardi, Simona Argenti: Development of composites hydrogels containig hyaluronic acid and poly-lactic-co-glycolic microparticles for cell delivery in regeneration medicine, Advances in Drug Delivery and Biomaterials: facts and vision (CRS Italy Chapter Annual Workshop), Padova, 2018
- Ludmila Žárská, **Zuzana Malá**, Hana Kolářová: Photodynamically active substances and their use for photodynamic therapy of tumors, Advances in Drug Delivery and Biomaterials: facts and vision (CRS Italy Chapter Annual Workshop), Padova, 2018
- **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Kateřina Bogdanová, Milan Kolář, Hana Kolářová: Synergistic antibacterial effect of photodynamic therapy combined with silver nanoparticles, Nanoinnovation 2018, Řím, 2018
- Ludmila Žárská, **Zuzana Malá**, Hana Kolářová: Development of composites hydrogels containig hyaluronic acid and poly-lactic-co-glycolic microparticles for cell delivery in regeneration medicine Nanoinnovation 2018, Řím, 2018
- **Zuzana Malá**, Ludmila Žárská, Kateřina Bogdanová, Milan Kolář, Hana Kolářová: Synergický antibakteriální účinek fotodynamické reakce a nanočástic stříbra, XXXX. Dny lékařské biofyziky, Praha, 2017
- Ludmila Žárská, **Zuzana Malá**, Hana Kolářová: Fotodynamicky aktivní látky a jejich použití při fotodynamické terapii nádorů. XXXX. Dny lékařské biofyziky, Praha, 2017