

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**NÁVRH A OPTIMALIZACE SERS SUBSTRÁTŮ PRO
DETEKCI B-LAKTAMOVÝCH ANTIBIOTIK
A MOŽNOU DIAGNOSTIKU REZISTENTNÍCH
BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ**

Bakalářská práce

Zdenek KRISTEN

Vedoucí práce: Mgr. Lucie HOCHVALDOVÁ, Ph.D.

Studijní obor: Aplikovaná chemie

Olomouc 2024

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci sepsal samostatně pod dohledem vedoucí bakalářské práce a že jsem uvedl všechnu použitou literaturu na konci práce. Prohlašuji, že jsem v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce neporušil autorská práva. Souhlasím s tím, aby byla tato práce přístupná v knihovně katedry fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 10. 5. 2024

.....

Zdenek Kristen
(podpis)

Tímto bych rád srdečně poděkoval Mgr. Lucii Hochvaldové, Ph.D. za odborný a milý přístup, cenné rady, za zhotovení doplňujících experimentů a věnovaný čas během vypracovávání bakalářské práce. Poděkování také patří celé katedře Fyzikální chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí laboratorního zázemí a všem jejím zaměstnancům, kteří mi byli jakýmkoli způsobem při zhotovování práce nápomocní.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Zdenek Kristen
Název práce:	Návrh a optimalizace SERS substrátů pro detekci β -laktamových antibiotik a možnou diagnostiku rezistentních bakteriálních kmenů
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Hochvaldová, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Abstrakt:	Bakteriální rezistence vůči antibiotikům je v dnešní době velmi rychle rostoucí problém. Rychlé rozlišení citlivé bakterie od rezistentní je pro účinnou léčbu infekcí zásadní, avšak standardně používané mikrobiologické testy jsou poměrně časově náročné. Tato práce se tedy zaměřuje na využití povrchem- zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS) k detekci strukturálních změn u β -laktamových antibiotik, ke kterým dochází po interakci s rezistentním bakteriálním kmenem. V rámci této práce byl navržen a optimalizován SERS aktivní substrát na bázi anizotropních nanočástic stříbra, jež by měl rozlišení umožnit a tento proces tak urychlit.
Klíčová slova:	Nanočástice stříbra, SERS, SERS substrát, Layer-by-Layer, antibiotika, ampicilin, β -laktamáza, bakteriální rezistence
Počet stran:	61
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Zdenek Kristen

Title: Design and optimization of SERS substrates for detection of β -lactam antibiotics and future diagnostics of resistant bacterial strains

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czech Republic

Supervisor: Mgr. Lucie Hochvaldová, Ph.D.

Year of presentation: 2024

Abstract: Bacterial resistance to antibiotics is a rapidly growing problem nowadays. Rapid differentiation between susceptible and resistant bacteria is essential for effective treatment of infections. However, the standard microbiological tests employed for this purpose are quite time-consuming. Thus, this work focuses on the use of surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to detect β -lactam antibiotics and their structural changes that occur after interaction with a resistant bacterial strain. In this work, a SERS active substrate based on anisotropic silver nanoparticles was designed and optimized to enhance its resolution and thus accelerate the diagnostic process.

Keywords: Silver nanoparticles, SERS, SERS substrate, Layer-by-Layer, antibiotics, ampicillin, B-lactamase, bacterial resistance

Number of pages: 61

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD.....	7
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS – Surface enhanced Raman scattering).....	9
1.1.1 Měření SERS	13
Metody přípravy SERS substrátů.....	15
1.1.2 Příprava nanočástic pro SERS substráty.....	18
1.1.2.2 Stabilizace nanočástic	21
1.1.3 Aplikace SERS	21
1.2 Bakteriální rezistence vůči antibiotikům.....	23
1.2.1 Antibiotika	23
1.2.2 Mechanismus rezistence	25
1.2.3 Detekce rezistentních bakterií.....	26
2 PRAKTICKÁ ČÁST.....	28
2.1 Použité chemikálie, bakteriální kmeny	28
2.2 Experimentální vybavení	28
2.3 Příprava vzorků	29
2.3.1 Příprava plasmonických anizotropních nanočástic stříbra.....	29
2.3.2 Příprava SERS substrátů.....	31
Srovnání připravených substrátů.....	32
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	39
3.1 Měření signálu ampicilinu pomocí SERS.....	39
3.2 Detekce změn ve spektrech ampicilinu	42
3.3 Testování bakteriální rezistence k ampicilinu.....	50
4 ZÁVĚR	52

ÚVOD

Tato bakalářská práce s názvem “Návrh a optimalizace SERS substrátů pro detekci β -laktamových antibiotik a možnou diagnostiku rezistentních bakteriálních kmenů“ se věnuje přípravě SERS substrátů (substrátů využívaných v povrchem zesílené Ramanově spektrometrii) za využití plasmonických anizotropních nanočástic stříbra a jejich aplikaci v detekci β -laktamového antibiotika, ampicillinu, a sledování jeho strukturních změn, jež by se daly v budoucnu využít k rozlišení citlivosti bakteriálních kmenů k danému antibiotiku.

SERS aktivní substráty jsou nejčastěji zhotoveny z kovových nanomateriálů, jako jsou zlato, stříbro nebo měď. Plasmonické nanočástice zmiňovaných kovů se vyznačují schopností interagovat se světelným paprskem za tvorby lokalizovaných povrchových plasmonů, které jsou příčinou výrazného zesílení signálu analytu. Tyto substráty lze využít k detekci široké škály analytů o velmi nízkých koncentracích a využívat je tak v řadě bio-medicínských aplikací.

Tato bakalářská práce nahlíží na problém narůstající bakteriální rezistence vůči běžně využívaným antibiotikům a na potenciální zrychlení administrace účinného antibiotika. To souvisí se snížením počtu nesprávně předepisovaných antibiotik, jež je jeden z významných faktorů, který přispívá k rychlejší tvorbě bakteriální rezistence. Rezistence bakterií bývá v současné době detekována pomocí mikrobiologických metod, založených na stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Ke stanovení MIC je ale nejprve nutné vykultivovat čistou bakteriální kolonii (1 den) a až poté ji otestovat, výsledky tedy získáváme nejdříve po dvou dnech od odběru vzorků. Metody založené na povrchem zesílené Ramanově spektroskopii by tuto inkubační dobu měly s ohledem na detekci signálu ve velmi nízkých koncentracích nejen urychlit, ale jelikož jsme v rámci SERS schopni detekovat strukturu testované látky, je předpokládáno, že by tato metoda mohla být použita i k detekci změny struktury β -laktamového antibiotika, jež bývá velmi často spojována s mechanismem rezistence vůči této skupině antibiotik. Mezi nejčastější mechanismy rezistence bakterií vůči β -laktamovým antibiotikům se řadí hydrolyza antibiotika pomocí bakteriálních enzymů (β -laktamáz), během které dochází k rozštěpení β -laktamového kruhu, základní struktury tohoto antibiotika, kterou bychom v rámci této práce rádi detekovali.

Obsah této práce je rozdělen na část teoretickou a část praktickou. V teoretické části práce jsou rozebrány kapitoly týkající se samotné SERS techniky a jejího využití, přípravě

nanočástic stříbra, SERS substrátů, antibiotik, bakteriální rezistence a metodám jejich detekce. V praktické části je zahrnut návrh přípravy SERS substrátu pomocí plasmonických anizotropních nanočástic stříbra a jeho optimalizace. Dále je pak pozornost věnována detekci ampicilinu pomocí SERS metody, a to s využitím vlastního i komerčně dostupného substrátu. Další oddíl praktické části je zasvěcen detekci změny struktury antibiotika po hydrolýze, jež má simulovat mechanismu rezistence bakterií vůči penicilinovým antibiotikům.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS – Surface enhanced Raman scattering)

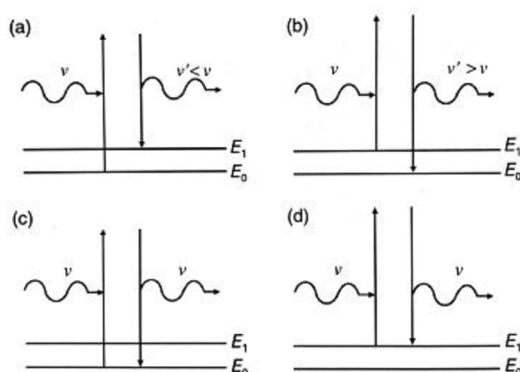
Samotný Ramanův rozptyl objevil a experimentálně demonstroval Sir C.V. Raman v roce 1928 pomocí jednoduchých optických materiálů s přístrojovým uspořádáním. Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (angl. Surface enhanced Raman scattering – SERS) byl poté náhodně objeven Fleischmannem a jeho spolupracovníky v roce 1974, když pozorovali dramatický nárůst (až 10^6) Ramanových signálů monovrstvy pyridinu adsorbované z vodného roztoku na zdrsňené stříbrné elektrodě. Tento ohromný nárůst signálu podnítl velký zájem o techniku a zůstává jednou z jejích hlavních výhod (1; 2).

Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie je velmi využívaná, efektní a povrchově citlivá snímací technika, která poskytuje informace o vibračních a rotačních stavech molekul. Umožňuje detekci i velmi malých koncentrací analytu. Principem metody je zesílení Ramanova rozptylu v důsledku interakce laserového monochromatického paprsku s nanostrukturami kovů a s molekulami analytů lokalizovanými na jejich povrchu. Zesílení signálu závisí na použití substrátu, ale obecně se udává, že faktor zesílení pro SERS je 10^{10} . Zmíněná interakce se označuje jako lokalizovaný povrchový plasmon (3; 4; 5).

Ramanův rozptyl

Ramanův jev byl jedním z prvních procesů, jejichž vysvětlení, převážně prostřednictvím práce Placzka v roce 1934, využilo a potvrdilo stále se rodící kvantovou teorii. Efekt Ramanova rozptylu je založen na neelastickém rozptylu fotonů, který vede k emisi rozptýleného světla s různou frekvencí spojenou s vibračními a rotačními stavy analytu. Samotný Ramanův rozptyl je obvykle velice slabý oproti Rayleigho rozptylu, kde rozptýlené fotony mají stejnou frekvenci jako fotony dopadající (elastický rozptyl). Rayleighův rozptyl proto není tak chemicky podstatný. Pod dopadajícím světlem však může docházet i k nepružným procesům rozptylu světla, které mají za následek emisi rozptýleného světla s menší frekvencí (Stokesova pásma) či větší frekvencí (anti-Stokesova pásma) v důsledku molekulárních vibrací (Obrázek 1). Tyto dva jevy se souhrnně označují jako Ramanův rozptyl. Tento rozptyl obecně zahrnuje přechody mezi energetickými hladinami, které jsou odděleny mnohem menší energií, než je energie dopadajícího světla.

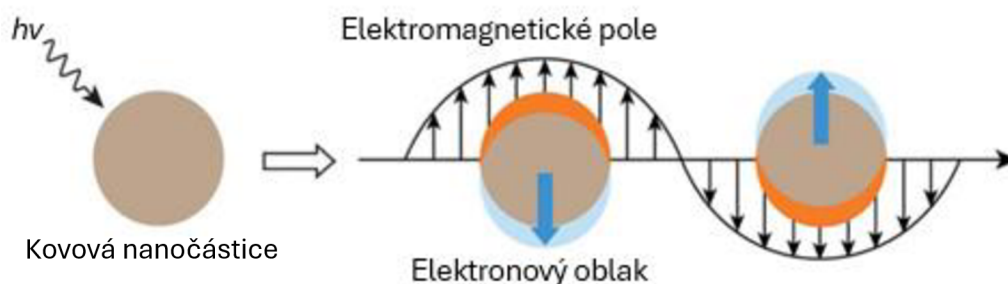
Dvě úrovně (např. E_0 a E_1 – viz Obrázek 1) jsou nejčastěji úrovně vibrační. Energie absorbovaných a emitovaných fotonů odpovídá viditelné oblasti záření či jeho blízkosti (3; 4; 6).



Obrázek 1. Diagramy energetických hladin ilustrující Ramanův a Rayleighův rozptyl. Příchozí záření vlevo, vznikající rozptýlené záření vpravo. (a) Stokesův přechod, (b) anti-Stokesův přechod, (c) a (d) Rayleighův rozptyl. (6)

Povrchový plasmon

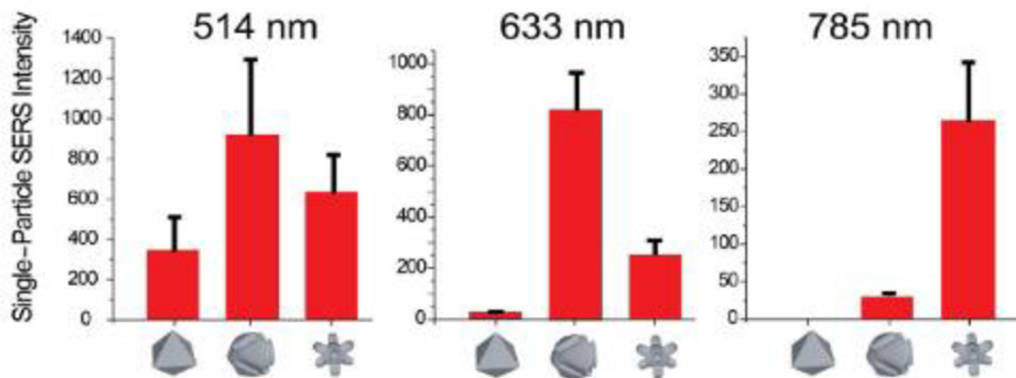
Koncept povrchových plasmonů pochází z plazmové formulace Maxwellovy teorie, kde se s volnými elektrony kovu (nebo vodivým elektronovým plynem) zachází jako s kapalinou o vysoké hustotě (plazma). Plazmové oscilace v kovech jsou kolektivní podélné excitace vodivého elektronového plynu a plasmony jsou kvanta reprezentující tyto oscilace nábojové hustoty. Takové oscilace mohou existovat v objemovém médiu a mohou být také lokalizovány na rozhraní mezi kovovým a dielektrickým povrchem, podél kterého se šíří jako vlny. V druhém případě se nazývají povrchové plasmony nebo povrchové polaritony. Šířící se fluktuační elektronové hustoty generují povrchově lokalizovanou elektromagnetickou vlnu, která se šíří podél rovinného rozhraní mezi kovem/dielektrickým médiem, přičemž elektrické pole je kolmé k tomuto rozhraní a exponenciálně mizí s penetrační vzdáleností od rozhraní (Obrázek 2) (4; 6; 7).



Obrázek 2. Ilustrace vzniku plasmonové rezonance na kovové nanočástici (7).

Tyto charakteristiky elektromagnetického pole jsou stejné jako ty, které popisují řízené povrchové vlny generované opticky, za podmínek úplného vnitřního odrazu, kdy se veškeré dopadající světlo odráží na hranici dopadajícího a nově vznikajícího prostředí. Za takových podmínek se však elektrické a magnetické pole na hranici náhle nezastaví, spíše pronikají na dálku do vznikajícího prostředí ve formě povrchové vlny. Ačkoli byla existence řízených povrchových elektromagnetických vln teoreticky předpovězena z Maxwellových rovnic a zkoumána během první dekády 20. století, teprve od roku 1960 začaly přitahovat zájem experimentátorů a termín „povrchový plasmon“ se začal používat. Částečně to bylo způsobeno tím, že byly vyvinuty metody, které umožnily optické buzení a detekci povrchově vázaných elektromagnetických vln. Ukázalo se, že Maxwellovy rovnice mají řešení vedoucí ke generování povrchového plasmonu elektromagnetické vlny pouze v případě, že jsou splněny podmínky: první – jedno ze sousedních médií má zápornou hodnotu pro reálnou část komplexní dielektrické konstanty a druhá – složka vlnového vektoru podél rozhraní mezi těmito dvěma prostředími splňuje rovnici, která zahrnuje dielektrické konstanty obou prostředí (4; 6; 8).

Ve zkratce tedy, když povrchové elektrony, které jsou původem z elektronů vodivostních, oscilují se světelným paprskem vzniká tzv. povrchový plasmon. Tyto plasmony mají určitou rezonanční frekvenci, při které nejúčinněji absorbují a rozptylují světlo. Frekvence se liší podle typu kovu a povahy povrchu, na kterém se měří. V případě nanočástic také velmi závisí na jejich velikosti, přičemž nanočástice menších rozměrů ve srovnání s většími nanočásticemi obecně vykazují silnější zesílení elektromagnetického pole. Mnohem důraznější účinek na povrchové plasmony má však tvar nanočástic (Obrázek 3) (9). Udává se, že stříbrné a zlaté plasmony oscilují na frekvencích odpovídající viditelnému záření. Proto se nejvíce používají laserové systémy, které mají vlnovou délku právě v této oblasti elektromagnetického záření (10).



Obrázek 3. Závislost zesílení signálu na tvaru nanočástic při daných vlnových délkách (9).

K popisu, jak dochází k zesílení signálu, existují dvě teorie. A to teorie elektromagnetická a chemická. Elektromagnetické zesílení nevyžaduje chemickou vazbu mezi adsorbátem a povrchem kovu. Vzniká z interakce mezi povrchovými plasmony na kovovém povrchu a analyzovanou, adsorbovanou molekulou. Na zdrsněném kovovém povrchu se však plasmony lokalizují a již nejsou omezeny a výsledné elektrické pole může vyzařovat jak v paralelním, tak v kolmém směru. Když dopadající foton dopadne na zdrsněný povrch, může dojít k excitaci plazmonové rezonance kovu, což způsobí zvýšení elektrického pole jak paralelně, tak kolmo k povrchu. Adsorbát se v tomto poli koupe a Ramanův rozptyl se zesílí (4; 6; 8).

Jako důvod chemického zesílení signálu je brán intermolekulární nebo intramolekulární přenos elektronů mezi analyzovanou molekulou a povrchem, na který je adsorbována. Důsledkem tohoto jevu je značné zvýšení molekulární polarizovatelnosti. Vyžaduje se specifická vazba mezi adsorbátem a kovem. Předpokládá se, že zlepšení z mechanismu přenosu náboje je výsledkem rezonančního Ramanova rozptylu z nových rezonančních mezilehlých stavů vytvořených vazbou adsorbátu na kov. Molekulární orbitály adsorbátu se rozšíří do rezonance interakcí s elektrony ve vodivém pásu. Rezonanční stavy, jejichž energie leží poblíž Fermiho energie, jsou částečně naplněny, zatímco ty ležící hluboko pod nimi jsou zcela naplněny (4; 6; 8). Je třeba zmínit, že obě teorie jsou stále předmětem diskusí mnoha vědeckých článků a jsou nadále zkoumány.

1.1.1 Měření SERS

Obecně existují dva přístupy k provádění měření SERS, a to „bez označení“ a „s označením“. Technika „bez označení“ měří přímé interakce mezi analyty a nanočásticemi. Výsledná spektrální pásma poskytují informace o vnitřní struktuře a o dynamice v biomolekulách přímo připojených k nanočásticím. Naproti tomu technika „s označením“ kombinuje optickou aktivitu plasmonických materiálů (Ag, Au, Cu atd.) funkcionalizovaných s SERS-aktivními messengerovými molekulami (tzv. Ramanovými „reportéry“), které rezonují se širokým rozsahem dostupných excitačních laserů. Rozpoznávací prvek (např. protilátka, enzym) připojený k povrchu nanočástice se váže na epitop(y) specifických cílových analytů (např. metabolit, nukleová kyselina nebo bakterie) a její plasmonicky zesílený charakteristický signál SERS je měřen nepřímo přes Ramanův reportér (11; 12; 13).

Dále se měření povrchem zesíleného Ramanova rozptylu může dělit na dvě kapitoly z pohledu prostředí, v němž se SERS signál měří, a to měření přímo v disperzi a měření na pevných substrátech.

1.1.1.1 Měření v disperzi

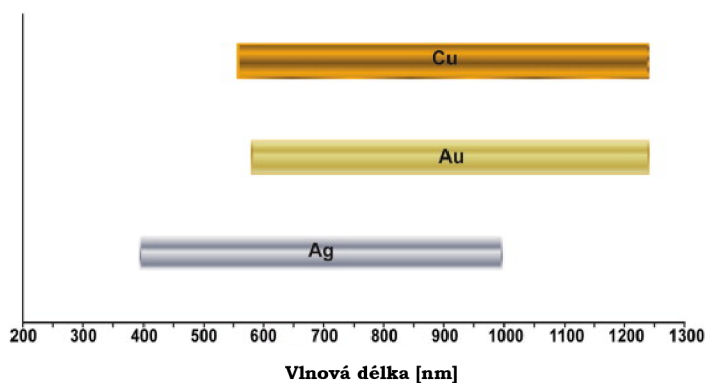
V poslední době se spíše využívají koloidní suspenze těchto ušlechtilých kovů, jejichž příprava není experimentálně náročná a ani příliš nákladná. Koloidy kovových nanočástic navíc umožňují přímou analýzu SERS v prostředí přirozeného roztoku analytu. Dále, jejich velký povrch a jejich rozptyl v kapalinách umožňují těsnou interakci adsorbent-adsorbát, takže analyt může být přirozeně zadržen na povrchu nanočástic. Přítomnost rozpouštědla a Brownův pohyb komplexů analyt-částice zaručuje minimální poškození vzorku, a to i při použití vyšších výkonů laseru. Na druhé straně koloidní a optické stability, které jsou v průběhu času obvykle narušeny, popř. nedostatek tzv. „hot spots“, mohou být zlepšeny a kontrolovány díky různým stabilizátorům a metodám. Hot spots jsou nanometrické mezery mezi nanočásticemi nebo jejich ostré hrany, kde dochází k zakoncentrování elektrického pole, které je způsobeno lokálními povrchovými plasmony. Spolehlivá analýza SERS je možná, protože pro každou analýzu je k dispozici nový povrch. Některé skupiny používají pro své experimenty vždy čerstvě připravený koloid, ale v poslední době je kladen důraz na získání reprodukovatelného, monodisperzního koloidu, který je stabilní několik měsíců. (14; 15; 16; 17).

Pro dosažení maximálního zesílení je vhodné zvolit správné rozměry nanočástic. Příliš velké částice umožní excitaci vyšších multipolárních módů, u kterých pole značně ubývá se vzdáleností a projevují se zde větší ztráty. U příliš malých částic může zase dojít k poklesu efektivní vodivosti. Maximálního zesílení pole je zpravidla dosaženo v místech s nejvyšší prostorovou křivostí nanostruktury, zejména pak v úzkých mezerách mezi jednotlivými nanočásticemi. Nejdůležitější je však podmínka, aby molekuly analytu byly co nejbliže (řádově jednotek nanometrů) povrchu kovových nanočástic (15; 16).

1.1.1.2 SERS substráty

Disperze nanočástic kovů lze rovněž použít i pro přípravu tenkých filmů, které přidávají reprodukovatelnost a multifunkčnost SERS analýze “on-field“. V posledních 40 letech byly hlavními substráty pro SERS a další povrchově vylepšené spektroskopické techniky ušlechtilé kovy, zejména zlato a stříbro. Navíc, podle studií, se používají i méně konvenční neušlechtilé kovy, jako je např. měď, hliník nebo lithium. V případě mědi je třeba si ale dávat pozor na její povrchovou oxidaci a na rozdíl od stříbra a zlata není tak stabilní, a je více reaktivní. I přes to je při porovnání zlata/stříbra s mědí z hlediska povrchového zesílení měď celkem slibným konkurentem. Substráty na bázi čisté mědi jsou schopné produkce povrchového vylepšení zhruba 10^6 - 10^7 , zatímco stříbro a zlato zesilují v průměru 10^8 - 10^9 . V ideálním případě by se excitace z laseru měla shodovat s rezonanční frekvencí plasmonu konkrétního vytvořeného povrchu a za podmínek, že se sníží účinnost absorpce světla a zvýší se účinnost rozptylu. Kromě kovů se zde jako substrátu SERS nabízí alternativní použití křemíkových (resp. SiO_2) plátek. Křemík je výrazně levnější než plasmonické kovové substráty a má pozoruhodnou srovnatelnou stabilitu (6; 18).

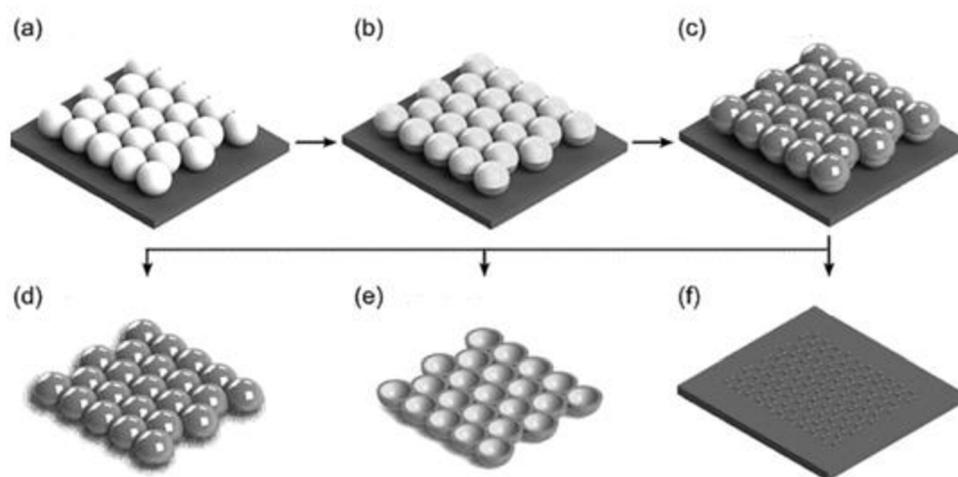
Všechny výše zmíněné substráty byly vybrány pro SERS substráty, protože mají schopnost poskytovat a udržovat povrchové plasmonové rezonance ve viditelné oblasti nebo v její blízkosti (Obrázek 4). Stříbro je pak v této oblasti nejčastěji používaným substrátem, zlato se naopak často používá zejména v blízké infračervené oblasti (14).



Obrázek 4. Přibližné rozsahy vlnových délek, kde Ag, Au a Cu byly dobře charakterizovány a mohou být použity jako SERS substráty (14).

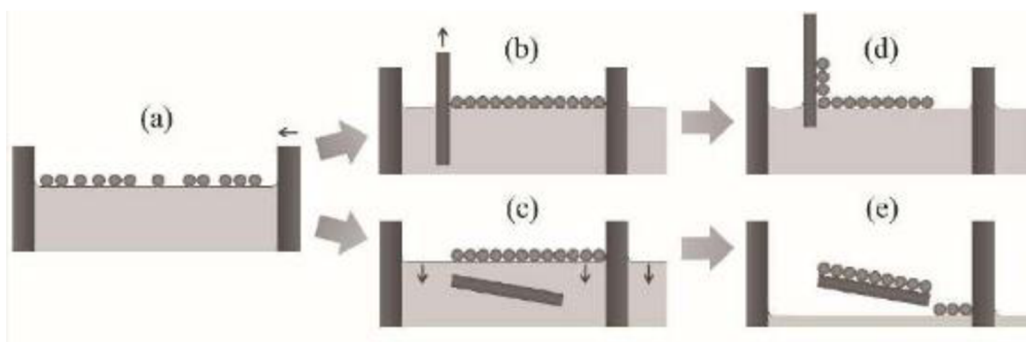
Metody přípravy SERS substrátů

Původní experimenty používaly k přípravě substrátů elektrochemické metody. Stupnice požadované drsnosti byla asi mezi 40 a 250 nm pro viditelné buzení stříbrem. Pracovní povrch elektrody byl často obtížně reprodukovatelný a v určitých prostředích náchylný k postupné oxidaci. Citlivá kvalitativní analýza je však možná i v případě použití elektrochemických metod. Jednou z v současnosti používaných metod, je elektrochemické pokovování pomocí templátů. Zde dochází k tvoření vrstvy na prázdných místech povrchu nosiče vytyčených templátem, po jehož odstranění zůstává kovový depozit disponující morfologií určenou póry templátu připojen k nosiči (Obrázek 5). Jako templát se volí tedy porézní materiál. Může být využit křemíkový plátek, který je ošetřen chemickým leptáním pomocí kyseliny fluorovodíkové, alumina, polystyren nebo litograficky upravené povrchy porézních materiálů (6; 19; 20; 21; 22).



Obrázek 5. Schéma přípravy substrátu pomocí elektrochemické depozice – a) templát, b) odpařování kovového filmu na templát, c) elektrochemický růst, d) a e) odstranění templátu a f) film kovu na podložce (21).

Další využívaná metoda na přípravu substrátů je tzv. Langmuir-Blodgettova metoda, která je založena na uspořádání částic na vodní hladině a vyniká svojí jednoduchostí, rychlostí a tvorbou monovrstev. Proces přípravy touto cestou lze rozdělit do tří kroků: první – aplikace nanočástic na hladinu vody, druhý – stlačení monovrstvy, tak aby částice zaujmuly co nejtěsnější uspořádání, třetí – transfer na pevnou podložku. Pro nanosení nanočástic na hladinu vody lze využít mikrolitrovou pumpu, ze které se pomalu vytlačuje disperze částic skrze kapiláru. Naskytuje se zde i možnost použití ruční aplikace pomocí pipety, ale v tomto případě je nutná co nejvyšší opatrnost. Stlačení vrstvy je možné realizovat mechanicky či s využitím povrchově aktivních látek, které vytvoří gradient povrchového napětí, čímž se vytvoří síla, která stlačí částice dohromady. Transfer na pevnou podložku lze provést prostým ručním podebráním pomocí pinzety nebo vložením podložky do nádoby s vodou ještě před nanosením nanočástic na hladinu a poté odsátím vody zespodu dojde k samovolnému nanosení vrstvy nanočástic na zvolenou podložku (Obrázek 6) (18; 23).



Obrázek 6. Ilustrace principu metody uspořádání částic na vodní hladině (dvě variace), a) nanosení částic na hladinu, b) a d) nanosení vrstvy částic na podložku pomocí pinzety, c) a e) nanosení částic na podložku pomocí odsátí kapaliny (18).

K přípravě tenkých filmů či vrstev nanočástic je možné využít mnoho dalších technik. Jako např. magnetronové napařování. Jedná se o nanášecí metodu využívající terč z vodivého materiálu, který je umístěn do vakuové komory a je na něj přivedeno vysoké napětí. Pracovní proces probíhá pod inertním plynem (např. argon). Mezi substrát a terč je aplikováno stejnosměrné napětí, což má za následek výboj a ten následně ionizuje plyn. Kladné ionty jsou přitahovány terčem, bombardují ho a záporné elektrony míří k substrátu. Na své cestě k substrátu se elektrony srážejí s atomy argonu a tvoří další ionty – cyklický proces. Jak těžké ionty dopadají na povrch terče, je terč narušován a rozprašované atomy jsou katapultovány pryč od terče, kde jim je do cesty postaven substrát. Atomy na substrátu

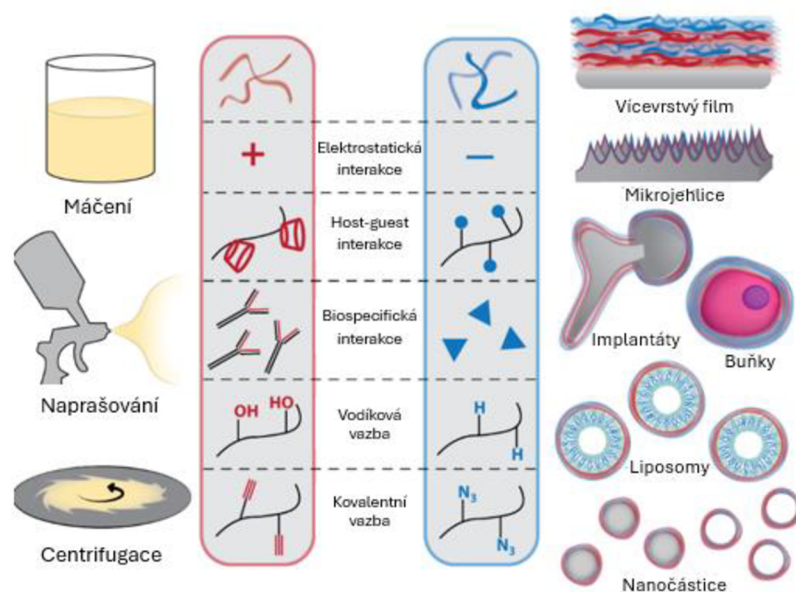
přicházejí do styku na molekulové úrovni, váží se k němu a vytvářejí tenkou vrstvu. Dalšími metodami může být drop-coating – nanášení kapek na podložku, dip-coating – ponoření podložky do požadované látky nebo metoda Layer-by-Layer, které je z důvodu jejího použití v experimentální části věnována další kapitola (19; 24)

Metoda Layer-by-Layer (LbL) (vrstva po vrstvě)

Jedná se o populární metodu používanou pro potahování substrátů polymery, koloidy, biomolekulami, ale i buňkami. Ve srovnání s jinými technikami nabízí jednodušší kontrolu připravených vrstev. Růst vrstev je realizován střídavým pokládáním látek, jež spolu interagují pomocí molekulárních interakcí. Nejvíce využívanou interakcí je elektrostatická, kde se jednotlivé vrstvy tvoří díky adsorpci opačně nabitých materiálů. Vodíkové vazby, van der Waalsovy a kovalentní vazby se ale rovněž dají využít (Obrázek 7) (25).

Objevení této techniky přišlo zhruba v polovině 60. let 20. století. Od té doby prošla řadou vylepšení a různými optimalizacemi. Jako substráty pro navázání tenkých filmů lze použít jak plošné, tak i částicové substráty. Mezi plošné substráty je možné zařadit např. křemenné sklo, plasty (např. PET), ale také kovy. Do částicových lze zahrnout liposomy nebo buňky (26).

Tradiční forma sestavování vrstvy po vrstvě využívá k podpoře adsorpce látek na pevný substrát kinetiku řízenou difuzí. V rámci pevných, rovinných podkladů se vrstvení provádí máčením nebo naprašováním. Zatímco pro částicové substráty je proces složitější a vyžaduje dispergování samotného substrátu v roztoku polymeru s následnou peletizací využívající centrifugaci pro promývací kroky (Obrázek 7). Jednotlivé materiály mohou být dodatečně upraveny tak, aby se smršťovaly, bobtnaly nebo praskaly díky různým vlivům, mezi které patří pH, teplo, volba rozpouštědla či přítomnost různých solí (25).



Obrázek 7. Schéma vyznačující hlavní procesy pro tvorbu vrstev (25).

Samosestavení polyelektrolytů využívá nejčastěji iontové výměny, při kterých nabitě polymerní segmenty nahrazují asociované protiionty. Na pevném substrátu je tedy třeba první vytvořit náboj, aby mohlo dojít k navázání elektrolytu. Jako elektrolyty se dají využít např. poly(diallyldimethylammonium chlorid), polyethylenimin, chitosan, kyselina polyakrylová nebo kyselina hyaluronová. Těchto polymerů existuje mnoho, a proto je zde uveden jen menší výčet. Po navázání vrstvy polymeru je substrát připraven pro navázání další látky s protějším nábojem (25; 26; 27).

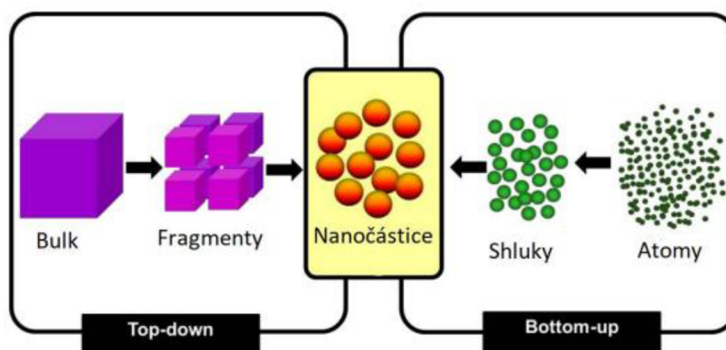
1.1.2 Příprava nanočástic pro SERS substráty

Pod pojmem nanočástice se rozumí takové částice, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 1 až 100 nm. U tak malých částic byly a stále jsou objevovány vlastnosti, které neexistují u chemicky totožné fáze, ale s makroskopickým rozměrem, související zejména s ohromným specifickým povrchem. Tento povrch výrazně ovlivňuje zejména adsorpční schopnosti a současně katalytickou aktivitu nanočástic související s vysokým procentem zastoupení povrchových atomů či molekul (vysoká povrchová energie). Navíc se zde uplatňují kvantové efekty spojené s rozbitím spojitých pásů dovolených energií pro elektrony v krystalech do diskretních hladin, u kovových nanočástic se projevují např. v silné absorpci světla určitých vlnových délek. Příčinou této absorpce je kolektivní oscilace elektronů na těchto hladinách ve stejné fázi s absorbovaným elektromagnetickým zářením – již zmiňovaný povrchový plasmon (28; 29).

Stříbrné nanočástice byly v posledních dvou desetiletích středem rozsáhlého výzkumu díky svým vynikajícím chemickým a optickým vlastnostem. Mají rozsáhlá uplatnění v mnoha oborech, například v elektronice, fotonice, biologii, medicíně, a hlavně v chemii. Nanočástice stříbra se staly populárními zejména svými biologickými účinky, mezi které se řadí významné antimikrobiální účinky, pak protirakovinné, antifungální a také prokázaly účinky při hojení ran (28; 30; 31).

1.1.2.1 Příprava nanočástic

Pro získání nanočástic různých tvarů a velikostí byly vyvinuty různé metody. Syntetické metody jsou založené na přístupu tzv. “od shora dolů“ (top-down), nebo “od zdola nahoru“ (bottom-up). V přístupu od shora dolů se objemové materiály rozkládají na nanočástice, zatímco proces od zdola nahoru je opakem. Zahrnuje shromažďování objektů, jako jsou atomy a molekuly (Obrázek 8) (32).



Obrázek 8. Schéma znázorňující postupy "top-down" a "bottom-up" (76).

Metody přípravy nanočástic můžeme také rozdělit na fyzikální, chemické a biologické. Mezi fyzikální metody, které se řadí mezi Top-down metody, patří například odpařování-kondenzace, laserová ablace a mechanické mletí. Nepřítomnost kontaminace rozpouštědlem v připravených tenkých vrstvách a rovnoměrnost distribuce nanočástic jsou výhodami metod fyzikální syntézy ve srovnání s chemickými procesy. Tyto metody jsou však náročné na spotřebu energie v důsledku používání vysokých tlaků a teplot. Proto se uvádí, že fyzikální přístupy jsou spojené s vysokými ekonomickými náklady. Chemické a biologické postupy spadají do metod Bottom-up. Do chemických metod je pak možné zařadit metody, kde se využívá elektronového ozařování, chemické redukce, ale i fotochemické metody. Oproti těm fyzikálním jsou finančně nenáročné, ale nesou s sebou pár nevýhod, mezi které patří například používání toxických látek. Biologické neboli biosyntetické metody poskytují novou možnost pohodlné syntézy nanočástic pomocí přírodních redukčních a stabilizačních činidel. Jako možná ekologicky a ekonomicky příznivá alternativa k chemickým

a fyzikálním přístupům byla navržena biosyntéza kovových a polovodičových nanočástic pomocí organismů – jako jsou například rostliny, houby, mikrořasy a fotosyntetické bakterie, které obsahují různé biomakromolekuly díky kterým je možné uskutečnit přípravu nanočástic. Ve prospěch biologických metod syntézy je vhodné uvést, že vznikající nanočástice bývají ve srovnání s těmi abiotickými stabilnější a biokompatibilnější (29; 33; 34; 35). Většina z těchto metod je stále ve stádiu vývoje a dále se zkoumá jejich stabilita, agregace, kontrola jejich růstu, morfologie, velikost a její distribuce. Kromě toho jsou stále důležitými otázkami extrakce a čištění produkovaných nanočástic pro další aplikace.

Nejběžnější bottom-up metodou pro syntézu nanočástic je chemická redukce organickými a anorganickými redukčními činidly. Obecně se pro redukci používají různá redukční činidla, mezi významné patří tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4), hydrazin (N_2H_2), glukosa, fruktosa, maltosa, kyselina askorbová a N, N-dimethylformamid. Tato redukční činidla redukují kovové kationty na atomy čistých kovů, po kterých následuje aglomerace do oligomerních shluků. Tyto shluky nakonec vedou ke vzniku kovových nanočástic (33; 36; 37). Tetrahydridoboritanu sodného je využito například v metodě navržené Craightonem, Blatchfordem a Albrechtem, kdy je roztok dusičnanu stříbrného přidáván do intenzivně míchaného a chlazeného roztoku tetrahydridoboritanu sodného v poměru 1:6. Takto lze připravit třeba nanočástice o velikosti 5-20 nm (38). Jednou z často využívaných metod, která pro redukci stříbrných iontů používá organické látky, je tzv. Tollensův proces. Podstatou je redukce amoniakálního komplexu aldehydy nebo redukujícími sacharidy. Obměnami Tollensova procesu lze připravit nanočástice o velikosti 20-50 nm (38).

Optické vlastnosti nanočástic stříbra souvisí s jevem známým jako povrchová plasmonová rezonance (SPR – z angl. Surface Plasmon Resonance), spočívající v interakci vodivostních elektronů nanočástic s vnějším elektromagnetickým polem. Výsledná SPR je pak silně závislá na geometrických vnitřních faktorech, jako je velikost a tvar nanočástic, a také na vnějších faktorech, jako je index lomu okolního prostředí (30). Nanočástice o různých tvarech a velikostech lze připravit řízenou dvoustupňovou redukcí.

V průběhu let byla navržena řada různých syntetických cest pro produkci nanočástic stříbra různých tvarů. Pro tvary jiné než sférické, zahrnuje většina syntetických postupů dva samostatné kroky – nukleaci a následný růst částic. Nejprve se získají sférické nanočástice, které se ve druhém kroku převedou na jiný tvar. Sférické stříbrné nanočástice mohou být obvykle syntetizovány chemickou redukcí kovových iontů tetrahydridoboritanem sodným (NaBH_4) ve vodném roztoku a poté se mohou transformovat pomocí jiných chemikálií, jako

např. hydrazinem, redukujícími sacharidy nebo kyselinou askorbovou, na částice s různou morfologií (30; 39; 40). V případě stříbrných nanočástic tato technika zahrnuje redukci amoniakálního komplexu se stříbrem $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. V modifikovaném postupu jsou ionty stříbra redukovány redukčními činidly v přítomnosti amoniaku, čímž vznikají stříbrné nanočástice různých tvarů. V této metodě hraje koncentrace amoniaku a povaha redukčního činidla důležitou roli při řízení velikosti a morfologie stříbrných nanočástic. Bylo zjištěno, že nejmenší částice se tvořily při nejnižší koncentraci amoniaku. Zvýšení koncentrace amoniaku mělo za následek současné zvýšení velikosti částic a polydisperzity (33; 37; 41).

1.1.2.2 Stabilizace nanočástic

Pro zachování vlastností připravených nanočástic je důležité používat stabilizátory. Jedná se o prostředky ke stabilizaci disperzních nanočástic během přípravy kovových nanočástic a chránit nanočástice, které mohou být absorbovány nebo se vázat na povrchy nanočástic, aby se zabránilo jejich aglomeraci. Přítomnost povrchově aktivních látek obsahujících funkční skupiny (např. thioly, aminy, kyseliny a alkoholy) pro interakce s povrchy částic může stabilizovat růst částic a chránit částice před sedimentací, aglomerací nebo ztrátou jejich povrchových vlastností. Stabilizace může být provedena různými způsoby, například elektrostatickým odpuzováním, sterickou zábranou nebo zapouzdřením nanočástic (např. vytvořením micelární vrstvy na povrchu). Ionty tvoří hraniční vrstvy mezi disperzním prostředím a dispergovanou fází. Makromolekulární látky se adsorbují na povrchu nanočástic a vytvářejí mechanickou bariéru, která slouží proti agregaci. Mezi významné stabilizátory se řadí např. želatina, chitosan, dodecylsulfát sodný, polyvinylalkoholy nebo polyethylenglykoly (33; 36; 37; 42).

Účinnost stabilizace závisí na fyzikálně-chemických parametrech polymeru, jeho koncentraci, jeho adsorpci na povrch nanočástic a rozpustnosti v kapalném prostředí. Nadbytek stabilizátoru však může způsobit, že molekuly vytvoří druhou vrstvu, což také snižuje agregovanou stabilitu systému. Nedostatek stabilizátoru má za následek adsorbování více nanočástic na povrch jedné makromolekuly, což má za následek flokulaci (42).

1.1.3 Aplikace SERS

SERS technika je využívána v mnoha oblastech, včetně povrchových věd, lékařské a analytické chemie, dokonce i v odvětvích biologie a polymerů. Většinou najde své využití při detekci látek, ale může být také používána k monitorování katalytických reakcí (6). Substráty pro SERS jsou využívány pro řadu špičkových analytických aplikací, včetně

analýzy životního prostředí, detekce pesticidů, lékařské analýzy, veřejné bezpečnosti a dalších oblastí. Pesticidy, potravinářské přísady a další znečišťující látky v potravinách mohou způsobit otravu jídlem a mohou se také hromadit v lidském těle po dlouhou dobu. To může vést k poškození zdraví člověka a v nejhorších případech k jeho smrti (43; 44). SERS substráty se osvědčily jako mocný nástroj pro identifikaci molekul. Jejich aplikace mohou být v budoucnu rozšířeny do mnoha oblastí. Například pro detekci stopových množství výbušných látek a nelegálních drog při bezpečnostních kontrolách a také detekci biomolekul v biologickém výzkumu.

Pomocí metody SERS je možné v oblasti biochemie detekovat tzv. biomolekuly. Tím jsou myšleny molekuly, které jsou tvořeny samotnými organismy jako např. proteiny, DNA/RNA, lipidy, sacharidy atd. Kromě použitelnosti v biomolekulárních detekcích bylo také dosaženo povzbudivého pokroku ve vývoji sledování onemocnění založeného na SERS, včetně detekce rakoviny, prekursorů potratů, poškození mozku nebo COVID-19. Některé výzkumy poukazují i na využití SERS při analýze dechu v případě respiračních onemocnění (4; 6; 8; 11; 45).

V dnešní době je zájem především o vyvinutí vhodného SERS substrátu pro detekci patogenů, zejména tam, kde je potřeba vysoce citlivá a rychlá detekce (46; 47). Díky technice SERS je možné patogeny individuálně identifikovat, bez značení nebo použití specifických receptorů. V ideálním případě by detekce bioanalytů nebo mikroorganismů měla být možná z jediné kapky nanesené na navrženou detekční platformu. Schopnost SERS detekovat stopové koncentrace smrtících virů z něj dělá potenciálně vhodného kandidáta k odhalení subklinických a asymptomatických infekcí, jako je např. fungémie. S nepřetržitým vývojem přenosných Ramanových spektrometrů lze SERS využít pro rychlé určení diagnostiky ve zdravotnictví, zejména ve venkovských a odlehlých oblastech, kde jsou takové infekce vysoce rozšířené. (48; 49) Rychlé testování na patogeny v biologických tekutinách a jejich citlivost na antibiotika je náročná, ale životně důležitá laboratorní práce ve zdravotnictví. Diagnóza infekce močové trubice je například 24–48hodinový vícestupňový proces od identifikace patogenu k tzv. antibiogramu. Může vyžadovat opakovanou kultivaci a podávání širokospektrých antibiotik před definitivní diagnózou. Hlavním omezením současných metod je rychlost, protože i „rychlý“ test citlivosti na antibiotika v závislosti na kombinaci lékového organismu trvá celou pracovní směnu (cca 8 hodin), což může být v případě závažných sepsí fatální (48).

1.2 Bakteriální rezistence vůči antibiotikům

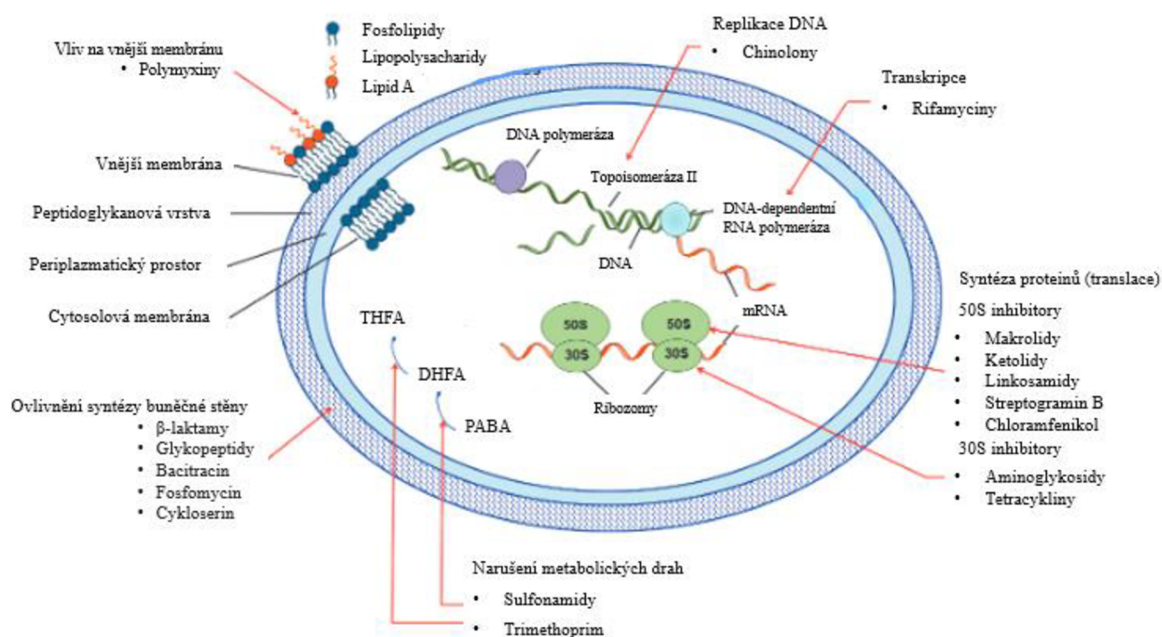
V posledních desítkách let je veden velmi obtížný boj proti bakteriím rezistentním vůči antibiotikům. Jde o velmi závažný globální problém, protože antibiotika se v dnešní době využívají při léčbě skoro všech bakteriálních onemocnění a tím, že antibiotika přestávají fungovat bychom se lehce mohli vrátit do pre-antibiotické éry, kdy i malé poranění kůže mohlo vést ke vzniku závažné infekce a následné smrti. V současné době narůstá počet rezistentních bakteriálních kmenů a navyšuje se terapeutická dávka antibiotika, což může vést k projevení se negativních účinků antibiotik a potenciální ztrátě terapeutických možností vůči danému bakteriálnímu kmeni. Je bezprostředně důležité vědět, jaká bakterie infekci způsobuje a čím ji následně léčit v souvislosti s citlivostí a rezistencí bakterií vůči antibiotikům. Ideálním řešením léčení infekčních onemocnění je léčba pomocí úzkospektrých léčiv (zabíjí jen určité typy/kmeny bakterií) a naopak limitovat použití těch širokospektrých. Pro každou bakterii je totiž potřebná jiná MIC, a tím pádem může docházet k vystavování bakterie subinhibičním koncentracím, bakterie si na tyto nízké koncentrace adaptuje a může si k nim vytvořit rezistenci.

Výzkum se v dnešní době zabývá syntézami nových, alternativních antibiotik. Jenomže jejich výroba je náročná jak z finanční stránky, tak i časově, a proto se farmaceutické firmy věnují spíše jiným oblastem vývoje léčiv. Možnými alternativami by mohlo být například "posílnění" účinku antibiotik různými antibakteriálními látkami (ať už nanočásticemi nebo různými synergiky) nebo naopak vyvinout rychlou metodu, pomocí které by se určil bakteriální kmen zapříčínující dané onemocnění a tím tak rozeznat rezistentní a citlivé kmeny bakterií (50; 51).

1.2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky běžně používaná při léčbě a prevenci bakteriálních infekcí. Vzhledem ke své struktuře a stupni afinity k cílovým místům se dělí na peniciliny, cefalosporiny, tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, sulfonamidy, chinolony, diaminopyrimidiny, polymyxin a karbapenemy. Antibiotika, která jsou specifická svým účinkem na různé bakteriální druhy, je kulminují následujícími způsoby: (i) ovlivněním syntézy buněčné stěny (β -laktamy), (ii) zacílením mechanismu syntézy proteinů prostřednictvím interakce s ribozomálními podjednotkami (tetracyklin, chloromfenikol, aminoglykosidy atd.) (iii) narušení mechanismu nukleových kyselin (rifamycin,

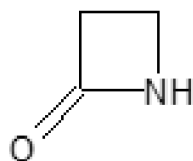
fluorochinolony), (iv) narušení metabolických drah (analogy kyseliny listové, sulfonamidy) a (v) narušení struktury vnější membrány (polymyxiny) (Obrázek 9) (52; 53; 54; 55).



Obrázek 9. Schéma základních antimikrobiální léčiv, jejich cíle a efekt na životně důležité procesy bakteriální buňky (57).

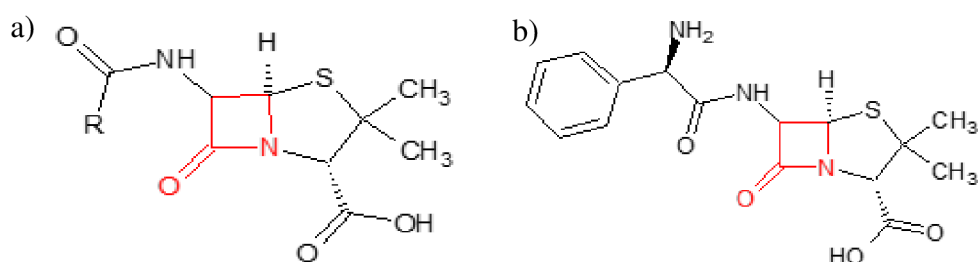
β-laktamová antibiotika

Jedná se o skupinu antibiotik, které jako základ své struktury obsahují β-laktamový kruh (Obrázek 10), který je vysoce reaktivní a je hlavním důvodem antibakteriálních vlastností těchto antibiotik. Od 40. let 20. století se β-laktamová antibiotika používají k léčbě bakteriálních infekcí. Jejich široké použití vyplývá z jejich profilu účinnosti a bezpečnosti. Do skupiny β-laktamových antibiotik se řadí: peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. Jejich účinek spočívá v navázání se na bakteriální enzym PBP (Penicillin-binding protein). Inhibicí enzymu dojde k rozpadu buněčné stěny, konkrétně struktury peptidoglykanu, v důsledku narušení peptidových a glycinových můstků. Vlivem osmotických dějů pak dojde k usmrcení bakterie (56; 57; 58).



Obrázek 10: Struktura β-laktamového kruhu (vytvořeno pomocí programu ChemsSketch).

Do skupiny β -laktamových antibiotik se člení rodina penicilinů. Znáмым zástupcem této skupiny ampicilin. Konkrétněji se řadí do skupiny aminopenicilinů, protože na základní strukturu penicilinu je navázán uhlovodíkový zbytek nesoucí arylovou a amino-skupinu (Obrázek 11). Ampicilin (AMP) se v současnosti nejčastěji podává ve formě kombinace se sulbaktamem (SBT), což je silný, vysoce specifický inhibitor enzymů – β -laktamáz, které způsobují rozklad antibiotika. Současné podávání ampicilin/sulbaktam (AMS), (Unasyn®; Pfizer Inc.), běžně v poměru 2:1, se úspěšně používá v klinické praxi k překonání β -laktamové rezistence u různých patogenních kmenů (59; 60).



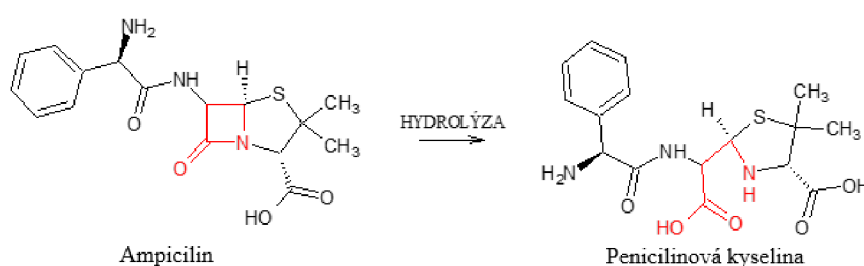
Obrázek 11. Struktury a) penicilinu a b) ampicilinu (vytvořeno pomocí programu ChemSketch).

1.2.2 Mechanismus rezistence

Antibiotika sama o sobě nezpůsobují rezistenci, ale častá a vysoká expozice antibiotik bakteriím vytváří selekční tlak, který spouští strategie rezistence bakterií. Hlavním důvodem je získání rezistentních genů a jejich šíření. Jejich přítomnost na mobilních genetických elementech usnadňuje přenos na nepříbuzné bakterie v procesu označovaném jako horizontální přenos genů (HGT – Horizontal Gene Transfer) prostřednictvím konjugace, transdukce nebo transformace. Transformace zahrnuje pohyb buněčné DNA mezi těsně spojenými bakteriemi, který je přenášen chromozomální sadou proteinů, které se vyskytují v přirozeně transformovatelných bakteriích. Konjugace potřebuje autonomně se replikující genetické prvky známé jako konjugativní plazmidy, které způsobují pohyb plazmidu z dárcovské buňky do přijímající buňky. Transdukce zahrnuje přenos DNA usnadněný bakteriofágy, konstituovanou hostitelskou DNA v jejich kapsidě a vložení této DNA do nového hostitele, kde se spojí s buněčným chromozomem a je zděděna. Pohyb genů propůjčuje příjemci nové metabolické schopnosti, a tím mu pomáhá v adaptaci na nové ekologické niky. Rezistence vůči antibiotikům propůjčená chromozomálními nebo mobilními genetickými elementy se dosahuje následujícími strategiemi: (i) snížení permeability membrány pro antibiotika buď snížením příjmu nebo zvýšením efluxu, (ii) inaktivací léčiva buď hydrolýzou nebo modifikací, (iii) změnou v cílovém místě léčiva a snížené vazebné permeabilitě a (iv) mutací. (61; 62; 63).

Mechanismus rezistence vůči β -laktamovým antibiotikům

Nejúčinnějším způsobem, jak mohou bakterie čelit β -laktamovým antibiotikům, je produkce β -laktamáz. β -laktamázy jsou enzymy hydrolyzující amidovou vazbu v β -laktamovém kruhu, společném prvku všech β -laktamových antibiotik. Produktem rozkladu β -laktamů je kyselina penicilinová (Obrázek 12). Při rozkladu antibiotik dochází ke změně struktury, konkrétně k otevření β -laktamového kruhu, čímž tato antibiotika ztrácí své antibakteriální účinky. Podle homologie aminokyselinových sekvencí se β -laktamázy dělí do čtyř molekulárních tříd: A, B, C a D. Enzymy tříd A, C a D jsou serinové hydrolázy a enzymy patřící do třídy B jsou pak metaloenzymy (57).



Obrázek 12. Schéma hydrolyzy ampicilinu na kyselinu penicilinovou vlivem β -laktamáz.

K překonání rezistence způsobené produkcí β -laktamáz v současnosti probíhá aktivní hledání inhibitorů těchto enzymů. V klinické praxi se k inhibici intenzivně používají kombinace β -laktamů s kyselinou klavulanovou, sulbaktamem a tazobaktamem (obsahují β -laktamový kruh, tvoří stabilnější acyl-enzymový komplex a mají nízkou rychlost deacylace) (57).

1.2.3 Detekce rezistentních bakterií

Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST) a Instituce klinických a laboratorních standardů (CLSI) doporučili použití fenotypového testování pro přesnou diagnostiku rezistence na antibiotika. Tento výzkumný přístup zahrnuje určení, zda se bakterie po přidání antibiotika množí, bez ohledu na mechanismus rezistence. Tyto testy pomáhají určit, která antibiotika jsou účinná a jaké dávky by měly být během léčby podávány. Tradiční postupy AST, jako je diskový difuzní test a mikrodiluční metoda spoléhají na vystavení bakteriálních izolátů řadě antimikrobiálních látek a vizuální detekci růstu (64).

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) je hlavním přístupem často používaným pro stanovení antimikrobiální citlivosti. Tento přístup se zaměřuje na měření nejnižší antimikrobiální koncentrace, která omezuje viditelný bakteriální růst, když se provádí buď na agaru nebo v bujónu. Při této metodě se roztoky obsahující specifikovaný počet bakterií zavedou na agar nebo bujón obsahující zředěné antimikrobiální koncentrace (65).

Klinická mikrobiologická analýza se tedy obecně zaměřuje na fenotypové přístupy k vyhodnocení vzorců antimikrobiální citlivosti patogenů. Tyto metody jsou stále relevantní díky svým výhodám, jako je dostupnost, snadné provedení a jasné kritérium pro výklad. Jsou však příliš těžkopádné na to, aby poskytovaly rychlé údaje o citlivosti, a tím neoddalovaly zahájení terapie. Například zpoždění zahájení antibiotické terapie bylo spojeno se zvýšením mortality i doby hospitalizace, což má negativní důsledky na léčbu pacientů. Aby se překonala omezení fenotypového přístupu a zlepšila se péče o pacienty i zvládnání rezistence na antibiotika, probíhá neustálé úsilí o pokrok ve vývoji technologií rychlého testování antimikrobiální citlivosti (AST – Antimicrobial susceptibility testing). Tyto techniky jsou navrženy tak, aby urychlily identifikaci patogenních organismů a vyhodnotily jejich citlivost na antimikrobiální látky (64; 66; 67; 68).

V klinické diagnostice existuje přibližně pět různých metod pro urychlení AST: (i) obcházení tradičních kultivačních metod přímou detekcí patogenu nebo mechanismu rezistence v počátečním vzorku; (ii) odstranění potřeby testování citlivosti na základě sekundární kultury; (iii) zkrácení doby potřebné pro analýzu a zlepšení citlivosti pro detekci infekčního činitele; (iv) zlepšení časné identifikace patogenu v počátečních stádiích onemocnění a při nižších mikrobiálních koncentracích a (v) včasná detekce vznikající lékové rezistence během léčby. SERS metoda by mohla zkrátit čas tím, že se vyhne nutnosti kultivace přes noc při stanovení MIC (64; 69; 70).

Vzhledem k tomu, že SERS dokáže zaznamenat makromolekulární otisky bakteriální buněčné membrány a buněčné stěny, lze jej použít ke stanovení účinnosti antibiotické léčby a také vzorců rezistence bakteriálních buněk na antibiotika. SERS je široce používán pro diferenciaci kmenů rezistentních na antibiotika a kmenů citlivých na antibiotika pravděpodobně kvůli variacím v biochemických složeních bakteriální buněčné membrány a buněčné stěny. Kromě detekce rezistentních bakterií je dalším hlavním výzkumným směrem studium pracovního režimu a mechanismu antibakteriálního účinku (70).

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Použité chemikálie, bakteriální kmeny

Tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4 , Sigma-Aldrich, prášek, $\geq 98,0\%$); amoniak (NH_3 , Sigma-Aldrich, vodný roztok, 28,0-30,0%); hydrazin hydrát ($\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, 50-60%); ampicilin (prášek, 0,5 g, BIOTIKA); citran draselný dihydrát ($\text{KH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, čistý, Lachema n.p. Brno); dusičnan stříbrný (AgNO_3 , Fagron), poly(diallyldimethylammonium) chlorid (PDDA, 20%, Sigma-Aldrich); chitosan (Sigma-Aldrich); kyselina chlorovodíková (HCl , 35%, Lach-Ner s.r.o.); kyselina sírová (H_2SO_4 , 96%, Pentachemicals); peroxid vodíku (H_2O_2 , 30%, Lach-Ner s.r.o.) komerční enzym (β -laktamáza, Sigma-Aldrich), nitrocefín (Sigma Aldrich), želatina (Pentachemicals), destilovaná voda.

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity standardní referenční bakteriální kmeny z České sbírky mikroorganismů, Masarykovy univerzity v Brně (Česká republika): *Escherichia coli* CCM 3954, *Escherichia coli* CCM 4225. Všechny kmeny byly standardně uloženy v kryozkumavkách (ITEST plus, Česká republika) při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Jako kultivační médium byl použit Mueller-Hintonův bujón (MH, Becton, Dickson and Company).

2.2 Experimentální vybavení

Automatické pipety, kádinky, odměrné baňky, míchátko, 24/96jamkové kultivační destičky, pinzeta, laboratorní lžice, mikrozukumavky Eppendorf, plastové kyvety, kyvety pro měření na DLS, Petriho miska, mikroskopická podložní sklíčka (Marienfeld-superior), silikonový plátek potažený zlatem (Sigma Aldrich), řezačka na sklo.

Technické vybavení: spektrofotometr Specord S600 (Analytic Jena AG), Ramanův spektrometr DXR (Thermo Scientific), analytické váhy (Kern 770), Zetasizer Nano ZS (Malvern), transmisní elektronový mikroskop (JEM 2010, Jeol), skenovací elektronový mikroskop (Hitachi SU6600), elektromagnetická míchačka (Heidolph MR Hei-Mix S), termostat (BINDER).



Obrázek 13. Přístroje zleva: Specord S600, DXR a Zetasizer Nano ZS

2.3 Příprava vzorků

2.3.1 Příprava plasmonických anizotropních nanočástic stříbra

Pro přípravu plasmonických anizotropních nanočástic stříbra (AgNPs) byla zvolena dvoukroková syntéza vycházející z redukce amoniakálního komplexu stříbra $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, který vznikl reakcí dusičnanu stříbrného a amoniaku. V rámci syntézy bylo využito dvou redukčních činidel, nejprve silného redukčního činidla, tetrahydridboritanu sodného, jež sloužil k tvorbě malých zárodků, na kterých byly v rámci druhého kroku pomocí slabšího redukčního činidla, hydrazinhydrátu, redukovány další částice, čímž docházelo k růstu zárodečných zrn. Ještě před přidáním redukčních činidel byl do soustavy také přidán dihydrát dihydrogencitrátu draselného, který zde hraje nejen roli stabilizátoru, ale právě díky změnám poměru citranu a redukčních látek dochází k tvorbě různě velkých částic s různou morfologií čili různých tvarů (koule, krychle, tyčinky, různé mnohoúhelníky atd.).

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky potřebných chemikálií o následujících koncentracích a objemech:

- 100 ml roztoku AgNO_3 o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 25 ml roztoku NH_3 o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml 1% (w/w) roztoku $\text{KC}_6\text{H}_7\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 200 ml roztoku NaBH_4 o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- 50 ml roztoku N_2H_4 o koncentraci $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

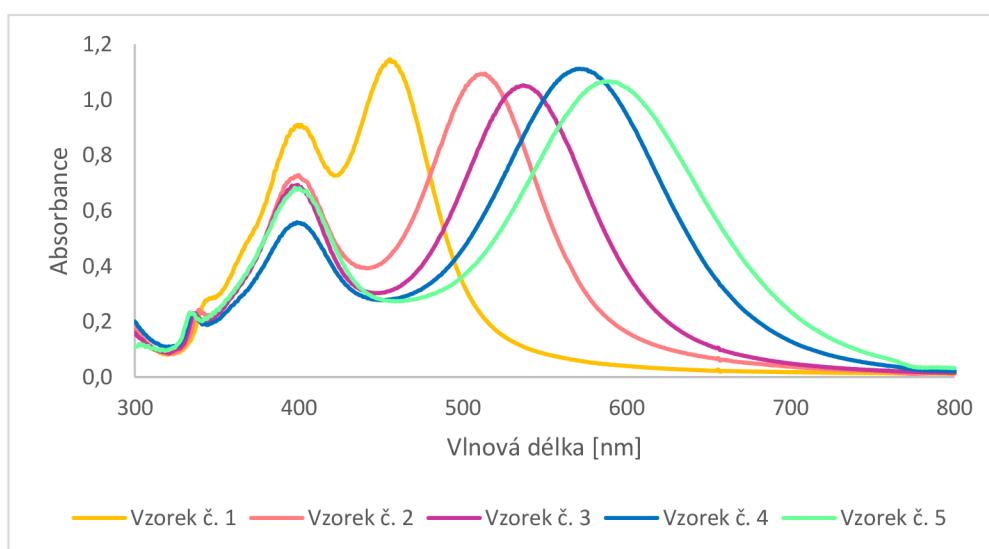
Koloidy byly za stálého míchání a laboratorní teploty připravovány na elektromagnetické míchače. Celkem bylo připraveno 5 vodných disperzí, přičemž chemikálie byly přidávány postupně tak, jak jsou vyobrazeny v Tabulka 1 (zleva doprava). Jednotlivé disperze se od sebe lišily přidáním stabilizátoru, ale vždy byl zachován konstantní objem připravené disperze (25 ml). Ihned po přidání prvního redukčního

činnidla, tetrahydridoboritanu sodného došlo ke zbarvení soustavy do žluto-oranžova, což bylo důkazem tvorby malých zárodků (71). Hydrazin, jako druhé redukční činidlo, byl přidán ihned po přidavku tetrahydridoboritanu sodného a v závislosti na množství přidaného citrátu docházelo k odlišnému zbarvení koloidu. Barva koloidu se ustálila a reakce proběhla obvykle do zhruba 5 minut, přičemž barva připravených koloidů závisela na absorpční kapacitě vznikajících částic, která je ovlivněná velikostí a morfologií částic, jež závisí na rozdílném poměru koncentrace citranu ku redukčním činidlům (72). Zbarvení jednotlivých disperzí (Obrázek 15) pak odpovídá měnícímu se absorpčnímu maximu příslušných spekter.

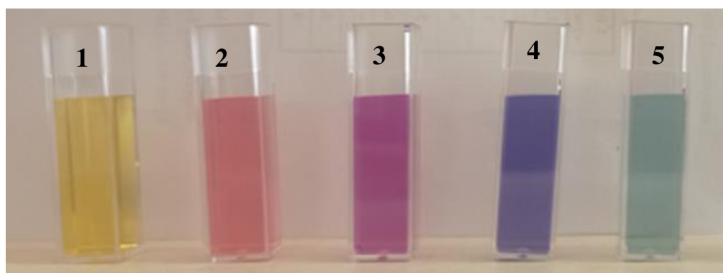
Tabulka 1. Množství přidávaných látek do soustavy (látky byly přidávány postupně zleva doprava)

Vzorek	AgNO ₃ [ml]	NH ₃ [ml]	KC ₆ H ₇ O ₇ ·2H ₂ O [ml]	H ₂ O [ml]	NaBH ₄ [ml]	N ₂ H ₄ ·H ₂ O [ml]
1.	5	1,25	0,25	14,425	75	4
2.			0,50	14,175		
3.			0,75	13,925		
4.			1,00	13,675		
5.			1,75	12,925		

V souvislosti s plánovanou aplikací připravených koloidních soustav v rámci Ramanovy spektroskopie byly zkoumány jejich plasmonické vlastnosti. Hlavně tedy absorpční maximum povrchového plasmonu (Obrázek 14). Cílem bylo vybrat vhodnou kombinaci koloidu a laserového zdroje, což je důležitým parametrem pro dosažení plazmonické rezonance a následného zesílení signálu (10).



Obrázek 14. Absorpční spektra desetkrát naředěných disperzí lišících se přidavkem citronanu sodného.



Obrázek 15. Výsledná zbarvení připravených disperzí po jejich 10násobném naředění (vzorek 1-5).

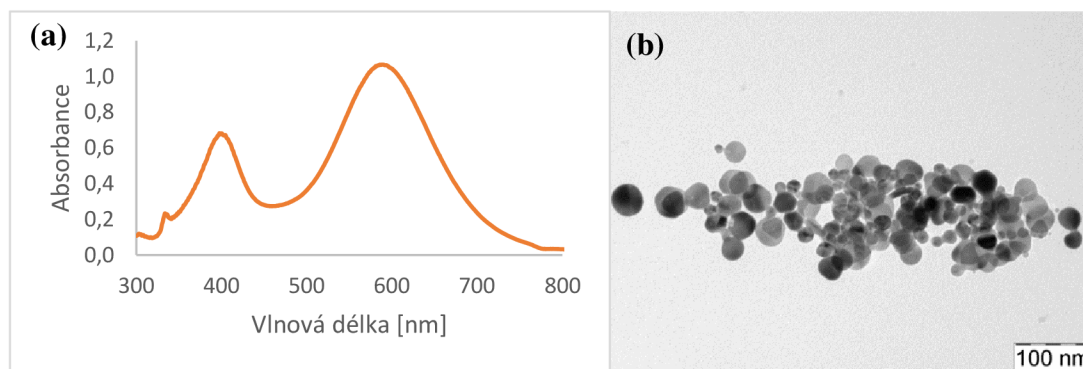
2.3.2 Příprava SERS substrátů

Substráty pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii se v dnešní době často vyrábí z materiálu, který má maximum povrchové plasmonové rezonance v oblasti viditelného záření, což je žádoucí, protože v metodě SERS se využívá laserů s vlnovou délkou právě v této oblasti (10). V posledních letech je kladen důraz na využití nanomateriálů v této technice, důvodem je výrazné zesílení Ramanova signálu díky tvorbě povrchových plasmonů, tedy vlivem plasmonové rezonance vznikají excitací vodivostních elektronů kovu, které pak oscilují na rozhraní kov-dielektrikum čímž dochází ke zvýšení intenzity elektromagnetického pole a zesílení signálu (10). Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda je možné připravit SERS substrát na bázi anizotropních plasmonických nanočástic stříbra a zda takto připravený substrát bude funkční k detekci námi vybraného antibiotika.

Jako pevný substrát, na který byl následně nanosen film nanočástic bylo zvoleno sklo, které bylo nařezáno na rozměr 1x1 cm, tak, aby jej bylo možné vložit do jamky 24jamkové kultivační destičky, ve kterých bylo dále funkcionalizováno. Pro nanosení jednotlivých vrstev byla zvolena metoda Layer-by-Layer (česky “vrstva po vrstvě”). Jedná se o metodu, která využívá střídavé nanášení vrstev látek, které jsou vůči sobě opačně nabitý. Sklo bylo na počátku ponořeno na 15 minut směsí Piranha (kyselina sírová a peroxid vodíku v poměru 7:3). Čištěním se narušila struktura povrchu sklíčka a vytvořil se tak záporný náboj, se kterým pak následně mohla interagovat následná, kladně nabitá vrstva. Pro přípravu kladně nabitých vrstev byly zvoleny následující polymerní látky: poly(diallyldimethylammonium chlorid, PDDA) a chitosan (CHIT) o koncentracích (w/w) 1% PDDA a 0,5% CHIT, přičemž PDDA byl rozpuštěný ve vodě a CHIT v 1% kyselině octové. Z těchto roztoků byly nadále připraveny roztoky (w/w) 0,25% a 0,5% pro PDDA a 0,25% a 0,125% pro CHIT, které byly dále použity k povrchové úpravě sklíčka. Sklíčka

v těchto roztocích stála po dobu 2 hodin a po uplynutí času byla vyjmuta a opatrně opláchnuta destilovanou vodou tak, aby se z povrchu smyl přebytečný nenavázaný polymer. Následně byla tato sklíčka potažená kladnou vrstvou polymeru ponechána volně na vzduchu zaschnout a následně sloužila k navázání poslední vrstvy, vrstvy nanočástic.

Z pěti disperzí byl, pro poslední vrstvu, vybrán vzorek č. 5 z důvodu jeho optických vlastností, konkrétně jeho oblasti nejvyšší plasmonové rezonance, která byla v rozmezí vlnových délek 580-620 nm s maximem absorbance 1,067 (Obrázek 16a). Na transmisním elektronovém mikroskopu (TEM) byl pořízen snímek nanočástic z této disperze (Obrázek 16b). Ze snímku lze potvrdit, že připravené nanočástice byly opravdu anizotropní, tj. různých tvarů (kolečka, trojúhelníčky a další mnohoúhelníky) a velikostí. Po zaschnutí byla sklíčka vložena do jamek s disperzí a ponechána zde po dobu 45 minut, aby se nanaslel tenký film nanočástic. Následně byla sklíčka opět vyjmuta a opláchnuta destilovanou vodou.



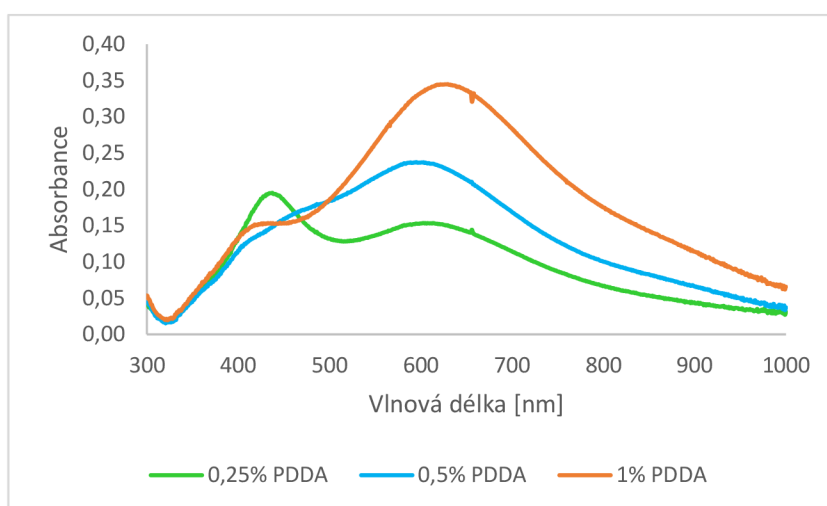
Obrázek 16. Absorpční spektrum vzorku č. 5 a TEM snímek nanočástic z tohoto vzorku.

Srovnání připravených substrátů

Jak už bylo zmíněno výše, příprava stříbrných substrátů vycházela z Layer-by-Layer metody, v rámci níž bylo využito připravených plasmonických anizotropních nanočástic stříbra, které nesou záporný náboj (zeta potenciál -28,2 mV) a proto bylo k navázání na sklíčko nutné využít kladně nabitého polymeru (PDDA a CHIT). V některých případech byly vrstvy nakonec zastabilizovány pomocí želatiny (0,5%), jež by mohla mít vliv na výslednou kvalitu připravené vrstvy a její stabilitu. V rámci vyhodnocení toho nejlepšího možného připraveného substrátu, který by dostatečně zesiloval signál analytu, byly studovány vlastnosti jednotlivých substrátů v závislosti na použitém typu (PDDA a CHIT) a množství určitého polymeru, proběhlé stabilizaci a množství vrstev nanočástic.

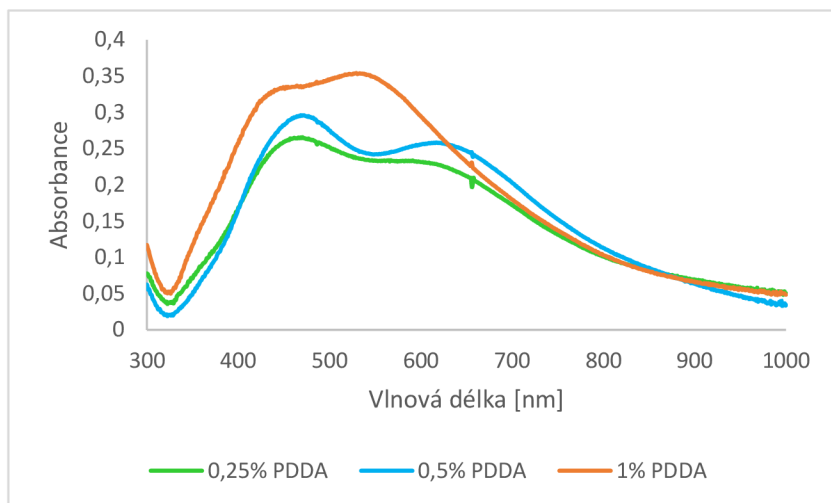
Na Obrázek 17 jsou vyobrazena absorpční spektra pro substráty připravené s použitím různě koncentrovaného roztoku PDDA (0,25%, 0,5% a 1%). Bylo zjištěno, že se zvyšující

se koncentrací PDDA se zvyšuje absorbance v absorpčním maximu a lze konstatovat, že se posouvá do vyšších vlnových délek. Nejvyšší absorbance bylo v tomto případě dosaženo při využití 1% PDDA. V následujících experimentech došlo k dalšímu navýšení koncentrace PDDA ve vzorku, po ponoření substrátu s navázanou vrstvou koncentrovanějšího PDDA do disperze nanočástic stříbra však i po pečlivém promytí docházelo k okamžité agregaci částic a tím tak bylo zamezeno úspěšnému navázání vrstvy nanočástic.



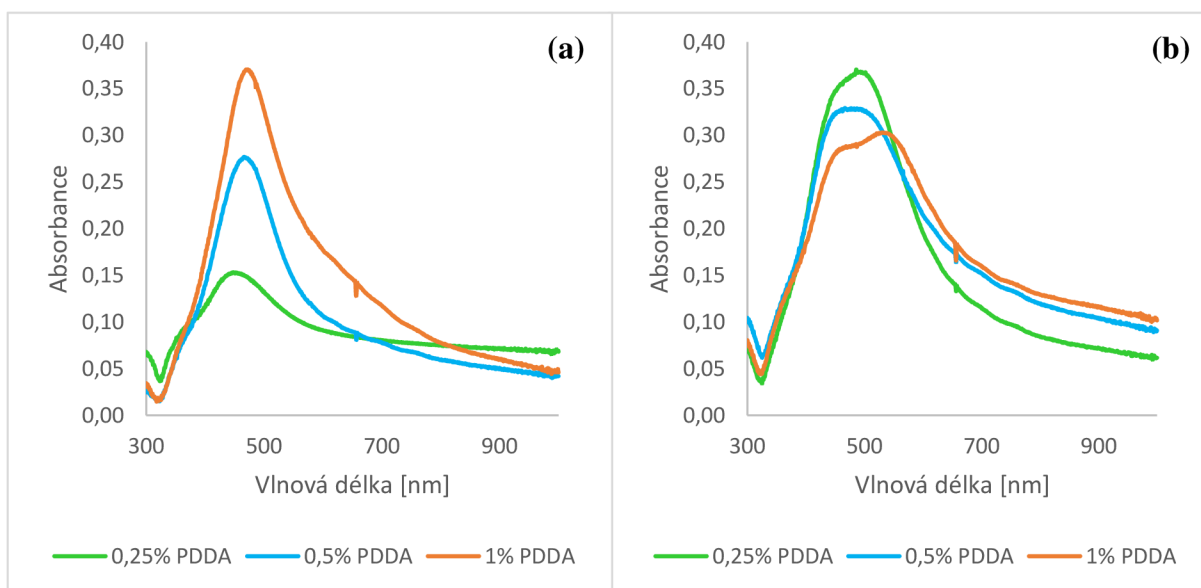
Obrázek 17. Absorpční spektra substrátů připravených s použitím různě koncentrovaného (0,25; 0,5 a 1%) roztoku PDDA.

Substráty připravené s použitím 0,25%, 0,5% a 1% roztoku PDDA byly následně stabilizovány 0,5 % želatinou a jejich absorpční spektra jsou zobrazena v grafu (Obrázek 18). Dá se říci, že jsou zde znatelné stejné trendy jako v případě nestabilizovaných sklíček (Obrázek 17), až na jeden fakt, a to že se zvyšující se koncentrací PDDA dochází k nárůstu absorbance a rozšíření maxim absorpčních píků (420-620 nm). Hodnoty absorpčních maxim (A_{\max}) s rostoucí koncentrací PDDA rostou, dochází tedy k navázání většího množství nanočástic.



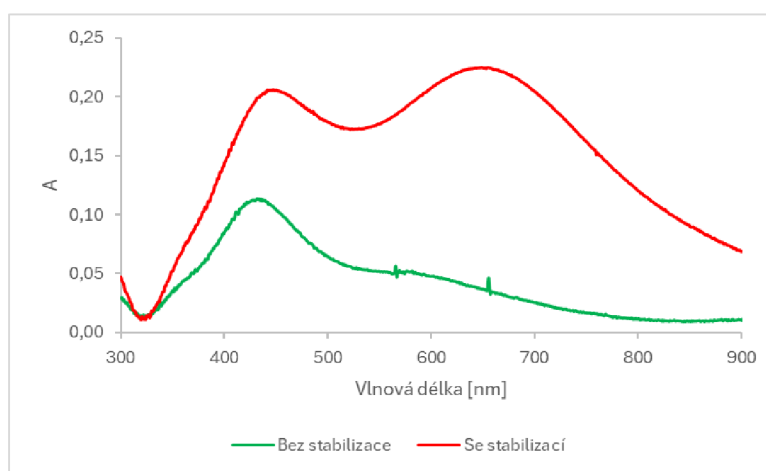
Obrázek 18. Absorpční spektra substrátů připravených s použitím různě koncentrovaného (0,25; 0,5 a 1%) roztoku PDDA stabilizované želatinou (w/w 0,5%).

Dalším pokusem, jak zvýšit absorbanci připraveného substrátu, bylo přidáním další vrstvy. Vrstva byla připravena analogicky dle zmíněného postupu, kterým se připravovala i vrstva první, jen se vynechal proces čištění v Piranha solution. Na Obrázek 19 a lze vidět, že stejně jako v případě jedné vrstvy bez stabilizace lze pozorovat trend zvyšující se hodnoty A_{\max} (řádově o desítky) se zvyšující se koncentrací PDDA. Po přípravě druhé vrstvy však dochází k posunu vlnové délky v A_{\max} k nižším vlnovým délkám (440–470 nm), což je pro naši aplikaci nežádoucí. Pokud je substrát se dvěma vrstvami stabilizován (Obrázek 19b), oplácí se zde stejný trend rozšiřujícího se absorpčního píku jako v případě jednovrstevných substrátů, vlnová délka při A_{\max} se pohybuje okolo 440–550 nm.



Obrázek 19. Absorpční spektra pro substráty s použitím různě koncentrovaného (0,25, 0,5 a 1%) roztoku PDDA bez stabilizace (a) a se stabilizací (b) nanočástic se dvěma vrstvami.

V rámci práce byl také pro navázání nanočástic jako náhrada za pozitivně nabitě PDDA vyzkoušen chitosan. Opět byly ozkoušeny různé koncentrace ((w/w) 0,5%, 0,25% a 0,125%), možnost stabilizace a různý počet vrstev. V případě použití chitosanu, jako kladně nabitého polymeru k navázání nanočástic, bylo postupováno stejně, jako v případě přípravy substrátu s využitím PDDA. Během vyhodnocování výsledků pro jednu vrstvu nanočástic bylo zjištěno, při využití vyšších koncentrací (0,5%, 0,25%) chitosanu se na sklíčku příliš dobře netvořila stříbrná vrstva a absorpční spektra byla zašumělá (v práci nejsou uvedena). V případě využití 0,125% chitosanu byla získaná spektra (Obrázek 20) jak nestabilizovaných, tak stabilizovaných vrstev, ze kterých bylo možné usoudit, že stabilizace pomocí 0,5% želatiny byla, stejně jako v případě využití PDDA, přínosná.

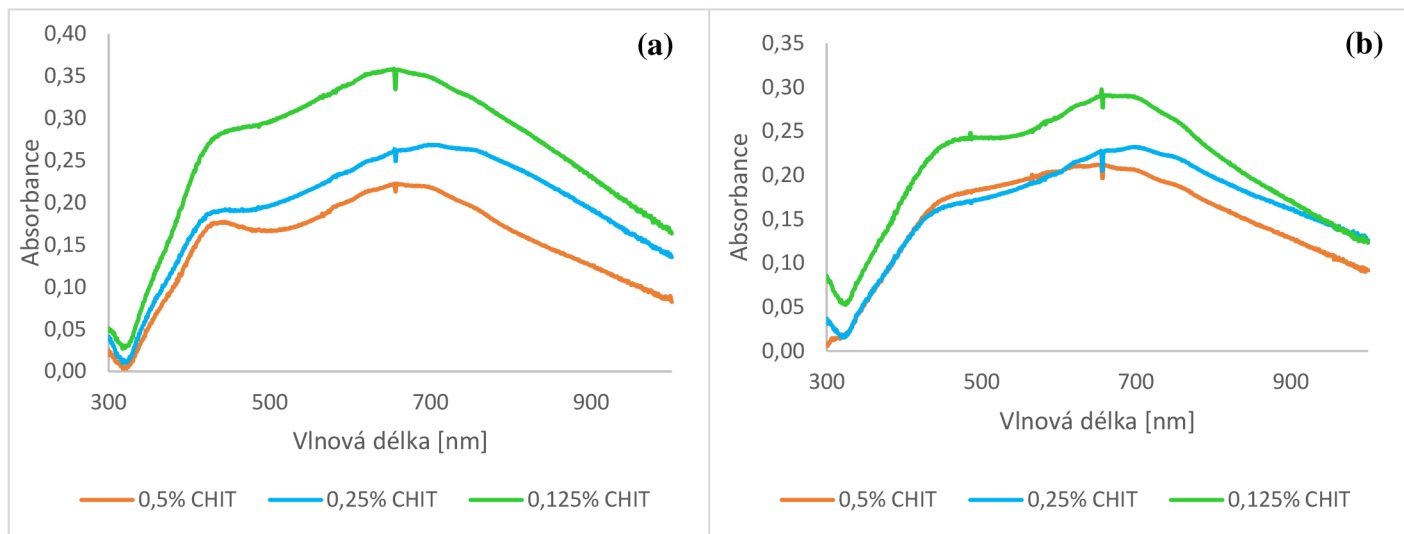


Obrázek 20. Absorpční spektra substrátu připraveného s využitím 0,125% chitosanu pro navázání jedné vrstvy nanočástic bez stabilizace a se stabilizací.

V případě spektra pro substrát bez stabilizace dosahuje hodnota absorpčního maxima hodnoty kolem 0,1 při vlnové délce cca 435 nm. Přičemž, po využití 0,5% roztoku želatiny pro stabilizaci vrstvy nanočástic bylo získáno spektrum s absorpčním maximem zhruba dvojnásobně vyšším, než v předešlém případě v nárůstu druhého píku v oblasti vlnové délky cca 650 nm. V porovnání s výsledky získanými ze substrátů s jednou vrstvou s použitím PDDA lze vyvodit, že závislost na koncentraci je zde opačná. Čím nižší koncentrace chitosanu byla použita, tím lepších výsledků bylo dosaženo. V případě stabilizace pak platí stejné trendy.

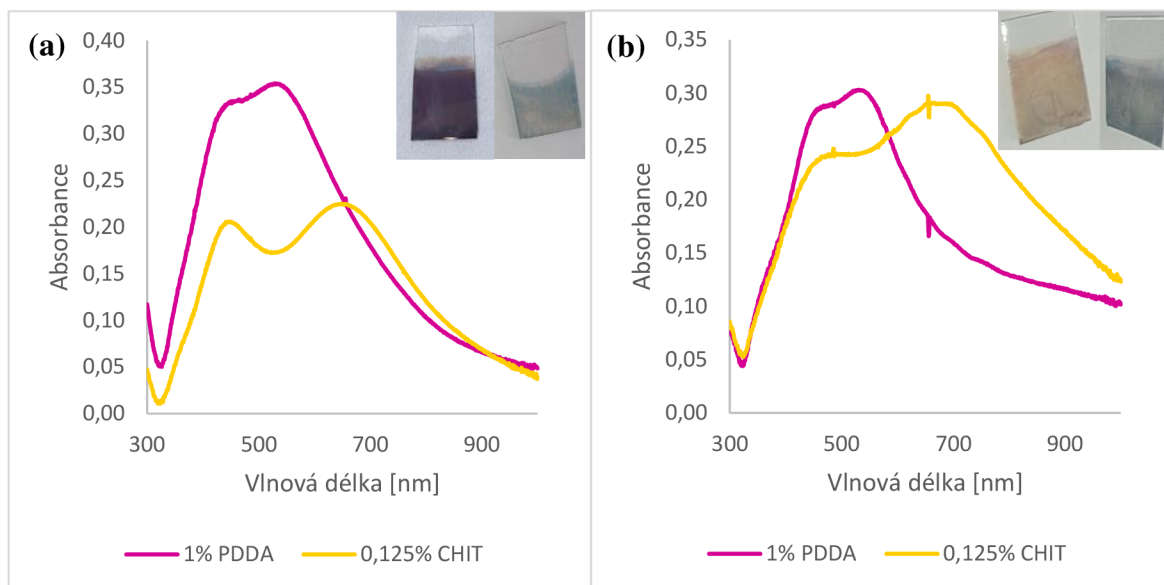
Nakonec byla v rámci optimalizace chitosanových vrstev vyzkoušena i možnost navázání další vrstvy nanočástic. Ta byla připravena stejným způsobem jako druhá vrstva při využití PDDA. V Obrázek 21a jsou vyobrazena absorpční spektra pro substráty s využitím 0,5%, 0,25% a 0,125% roztoku chitosanu bez stabilizace nanočástic a se dvěma vrstvami. V tomto případě lze vyvodit trend zvyšující se hodnoty absorpčního maxima se

snižující se koncentrací chitosanu. Vlnová délka při A_{\max} se však pohybuje ve stejných hodnotách a to od 630 do 750 nm. V případě spekter pro substráty s použitím 0,5%, 0,25% a 0,125% roztoku chitosanu se stabilizací nanočástic a se dvěma vrstvami (Obrázek 21b) se dá taktéž říci, že se snižující se koncentrací chitosanu narůstá hodnota A_{\max} , které se pohybuje zhruba ve stejném rozmezí vlnových délek jako v případě nevyužití 0,5% želatiny ke stabilizaci. Nutno podotknout, že ve výsledku byly chitosanové substráty se dvěma vrstvami homogennější než v případě jedné vrstvy.



Obrázek 21. Absorpční spektra substrátů s využitím různě koncentrovaného (0,125, 0,25 a 0,5%) roztoku chitosanu bez stabilizace (a) a se stabilizací (b) nanočástic se dvěma vrstvami.

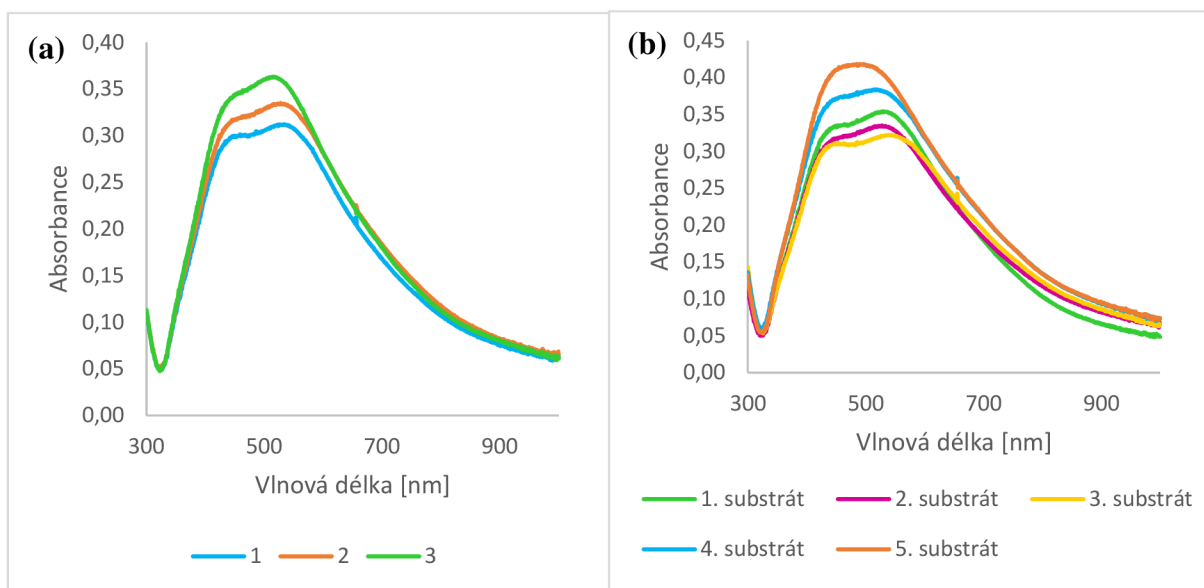
Substráty s jednou stabilizovanou vrstvou s použitím PDDA poskytovaly lepší výsledky než v případě použití chitosanu. Jevily se více homogenně a obecně byly vyšší i hodnoty absorpčních maxim (Obrázek 22a). Naopak v případě dvou vrstev bylo dosaženo lepších výsledků, co se týče šířky plasmonických píků, u varianty s chitosanem (Obrázek 22b). Došlo k rozšíření píků, hodnoty absorpčních maxim se nějak zásadně neměnily.



Obrázek 22. Absorpční spektra dvou vybraných nejlepších stabilizovaných (a) jednovrstevných a dvouvrstevných (b) substrátů s rozdílem použití polymeru a fotografie těchto substrátů (zleva 1% PDDA a 0,125% CHIT).

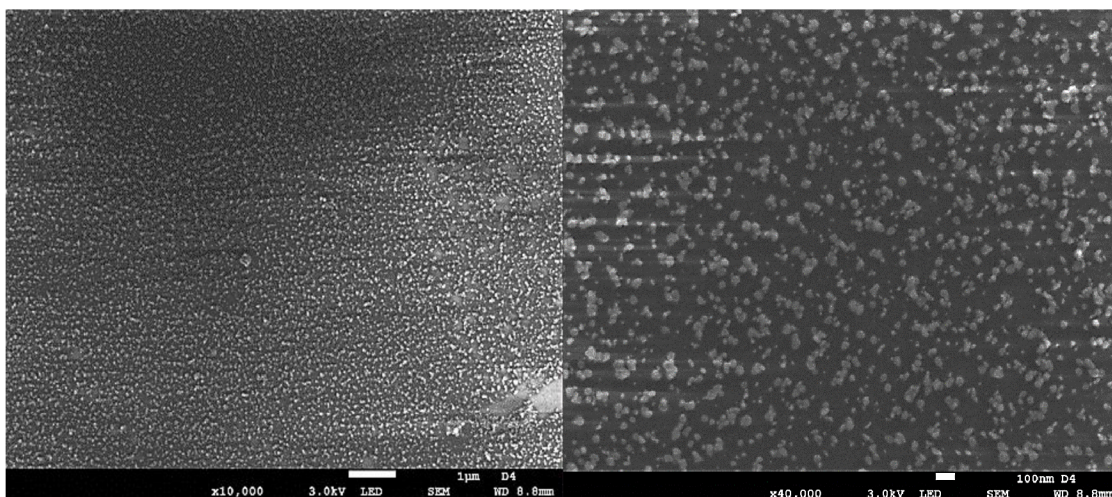
Stříbrné substráty využívající k navázání stříbra 1% PDDA stabilizované želatinou vykazovaly jak v případě jedné tak i dvou vrstev nejvyšší absorbanci v oblasti 400-600 nm. Substráty připravené s využitím 0,125% chitosanu vykazovaly nejvyšší absorbanci, v případě přítomnosti jedné i dvou vrstev, v oblasti 600-700 nm s tím, že hodnoty A_{\max} byly nižší než v případě 1% PDDA.

Z hlediska časové náročnosti přípravy vrstev, vlivu stabilizace pomocí želatiny a použitého laseru (532 nm) se usoudilo, že pro prvotní SERS experimenty bude vybrán 1% roztok PDDA s následnou stabilizací a připraví se pouze jedna vrstva. Všechna sklíčka se tedy nejprve vyčistila pomocí Piranha solution, jamky se naplnily 1% PDDA, k navázání nanočástic stříbra byla použita disperze č. 5 (108 mg/L AgNPs) a nakonec se sklíčka vložila do 0,5% roztoku želatiny. Po optimalizačních experimentech (viz výše) byla tedy připravena řada stříbrných substrátů, jež sloužila k dalšímu testování a na jejich povrchu byly provedeny všechny experimenty v rámci SERS experimentů, jež jsou označeny jako Ag-substrát. Absorpční spektra takto připravených substrátů ukázala, že připravené substráty jsou v rámci jednoho sklíčka (Obrázek 24a) i řady připravených vzorků (Obrázek 24b) víceméně homogenní. Nejvyšší absorbanci měly substráty v oblasti 410 až 550 nm. Hodnoty absorpčních maxim se pohybovali v rozmezí 0,3 až 0,4.



Obrázek 24. (a) Absorpční spektra jednoho ze substrátů naměřené na třech různých místech na substrátu, (b) reprezentativní absorpční spektra pěti vybraných substrátů určených pro SERS měření.

V rámci práce byly pořízeny i snímky substrátu pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), které jsou vyobrazeny na Obrázek 23 a zobrazují rovnoměrné rozmístění nanočástic na skleněném substrátu. Takto připravené substráty byly využity k měření na povrchu zesílené Ramanovy spektroskopie.



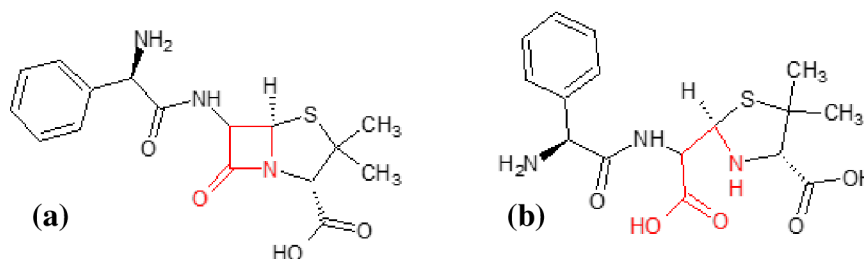
Obrázek 23. SEM snímky vybraného připraveného Ag-substrátu při různém zvětšení.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Měření signálu ampicilinu pomocí SERS

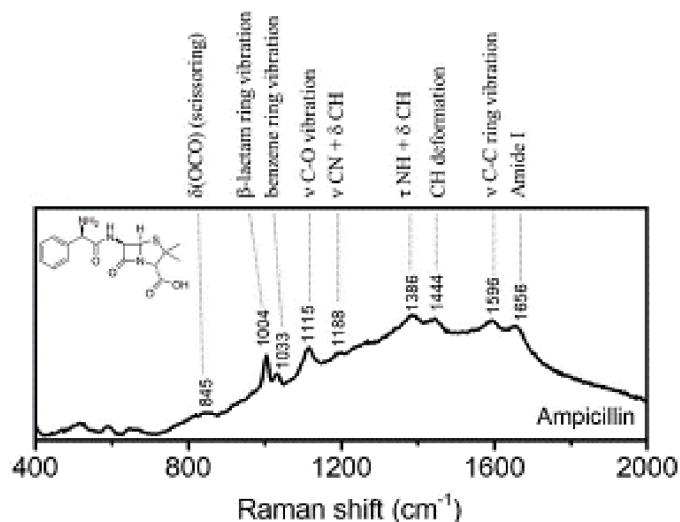
Při měření na Ramanově spektrometru byly využity dva substráty, a to komerční zlatý (Sigma-Aldrich) a v rámci experimentální práce připravený stříbrný substrát (Ag-substrát). Pokud není uvedeno jinak, tak byl na měření použit laser o vlnové délce 532 nm a jeho výkon byl při měření nastaven na 9 mW. V rámci této bakalářské práce byla naše pozornost zaměřena na typického představitele β -laktamových antibiotik, ampicillin (AMP) a detekci jeho změny struktury.

Pomocí techniky SERS bylo zkoumáno, zda je možné touto metodou sledovat signál β -laktamového kruhu antibiotika a naměřit jeho rozpad, ke kterému dochází po jeho hydrolyze. Přičemž, k této strukturní přeměně v praxi dochází vlivem jednoho z nejčastějších mechanismů resistance bakterií vůči β -laktamovým antibiotikům. Některé rezistentní bakteriální kmeny tvoří betalaktamázy, což jsou enzymy, které katalyzují hydrolyzu β -laktamových antibiotik za vzniku kyseliny penicilinové. Dle rozdílné struktury ampicilinu a kyseliny penicilinové (Obrázek 25) by tedy měly být pozorovány změny ve spektrech a tím pak v budoucnu rychle rozlišit citlivou a rezistentní bakterii.



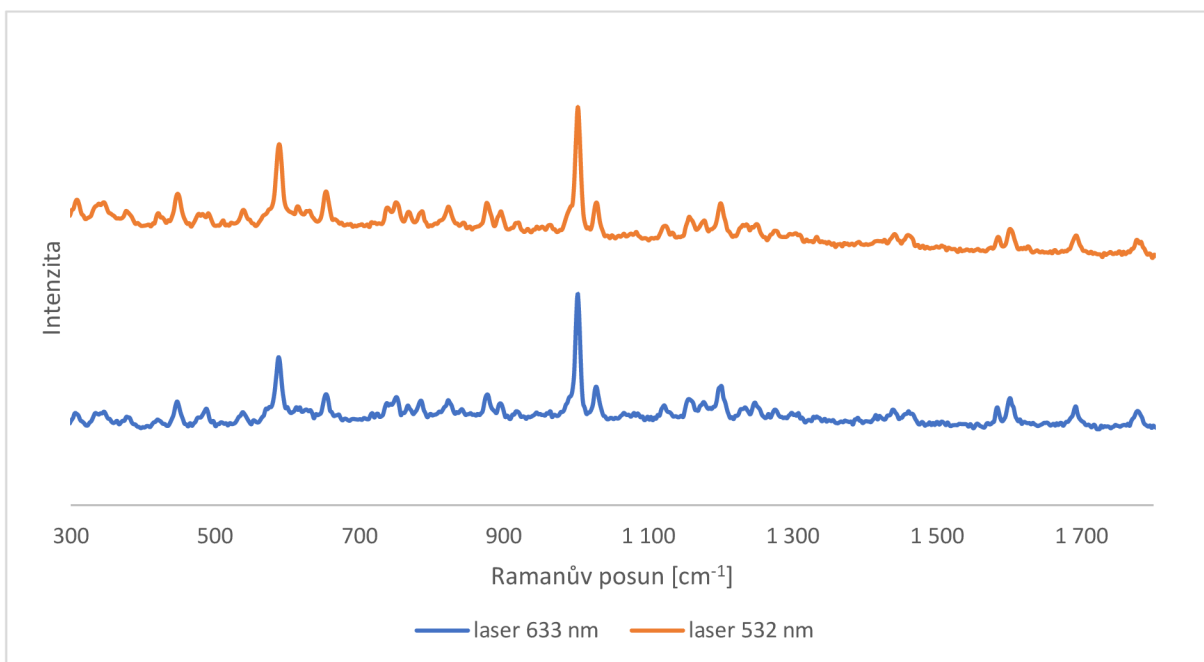
Obrázek 25. Struktury ampicilinu (a) a kyseliny penicilinové (b).

Ramanovské spektrum pro ampicilin se vyznačuje hned několika píky. A to v oblastech 1658, 1600, 1495, 1444, 1386, 1328, 1212, 1188, 1115, 1033, 1000, 845 a 590 cm^{-1} (Obrázek 26). Ty nejvíce charakteristické jsou 1000 a 1600 cm^{-1} . Tyto píky odpovídají vibraci β -laktamového kruhu (73; 74; 75).



Obrázek 26. SERS spektrum vyznačující charakteristické píky ampicilinu (73).

Ampicilin byl prvně přeměřen ve formě prášku pomocí Ramanovy spektroskopie na obyčejném skle, aby bylo zjištěno, jaký laser, resp. laser o jaké vlnové délce, bude ideální volbou pro následující měření. Bylo využito dvou laserů, a to o vlnových délkách 532 a 633 nm. Při měření byl jejich výkon nastaven na maximum a výsledná spektra jsou vyobrazena na Obrázek 27.

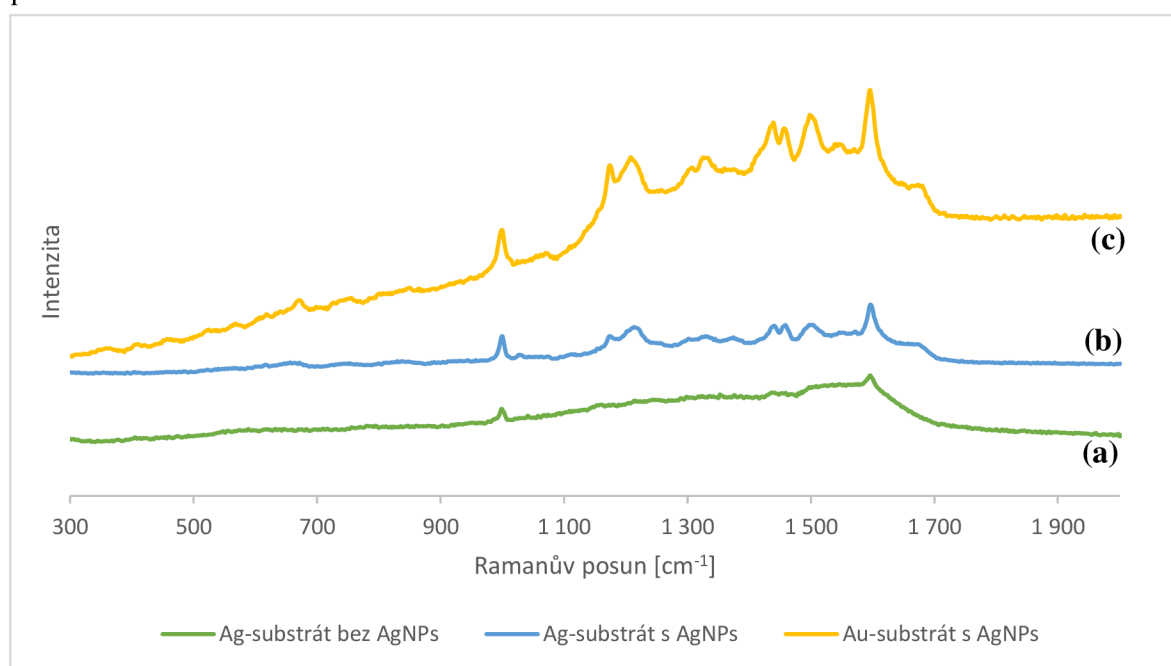


Obrázek 27. Ramanovská spektra pro práškový ampicilin s využitím různých laserů.

Ze získaných spekter lze vidět, že oba lasery v rámci intenzity signálu, velice podobně detekují signál ampicilinu. Jenomže laser o vlnové délce 532 nm přece jen lépe zesiluje píky nižších intenzit, a proto se v rámci práce rozhodlo jej využívat u dalších experimentů.

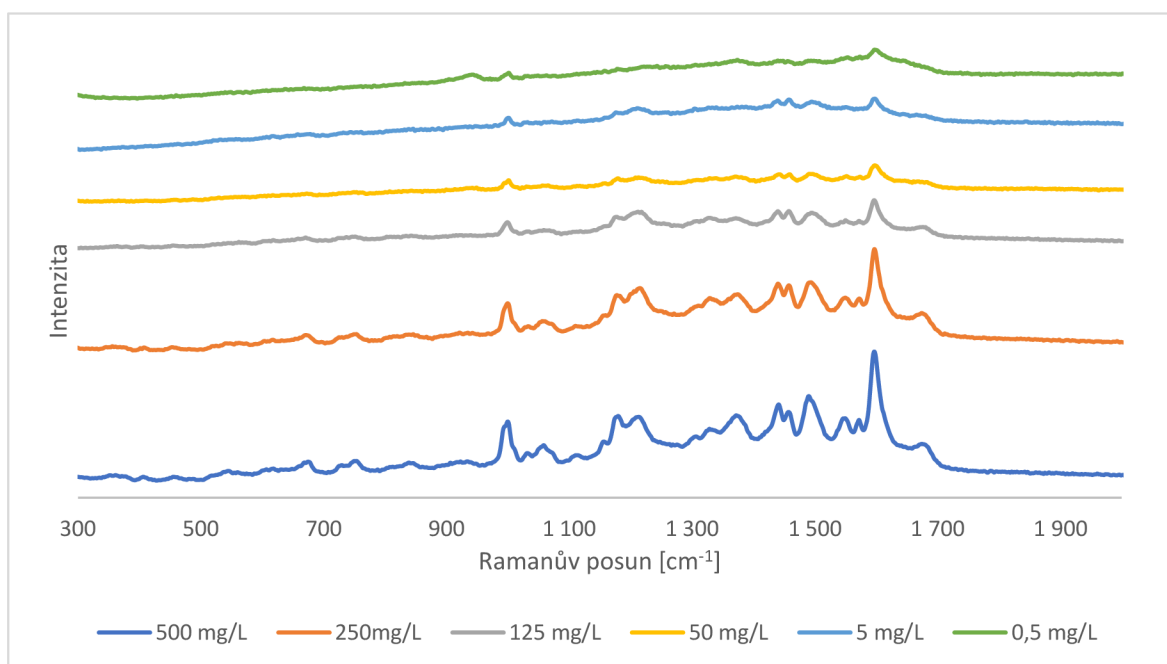
Čistý práškový ampicilin byl rozpuštěn ve vodě na výslednou koncentraci 1000 mg/L. Výsledný roztok byl ve formě kapky nanesen na připravený stříbrný substrát (Ag substrát bez AgNPs) a nechala se volně zaschnout. Poté bylo měřeno Ramanovské spektrum pro ampicilin (Obrázek 28a). Na získaném spektru byly dobře detekovatelné dva hlavní píky symbolizující vibrace β -laktamového kruhu (1000 a 1600 cm^{-1}), ale zbylé, které symbolizují ampicilin, nebyly detekovány. Z tohoto důvodu byly k roztoku ampicilinu přidány nanočástice stříbra z připravované disperze č. 3 v poměru 1:1, koncentrace ampicilinu ve vzorku tedy klesla na 500 mg/L a koncentrace AgNPs na 54 mg/L.

Vlivem přidavku nanočástic došlo ke zlepšení signálu ampicilinu, charakteristické píky byly výraznější, a dokonce došlo k objevu i dalších píků ampicilinu (Obrázek 28b, c). Koloidní částice v kombinaci s Au-substrátem se jeví jako nejlepší kombinace. Nadále se tedy měřily vzorky s přidavkem koloidních nanočástic ve formě zaschlé kapky na příslušném substrátu.



Obrázek 28. SERS spektra pro AMP na Ag-substrátu (a), na Ag-substrátu s přítomností AgNPs (b) a na zlatém substrátu s přítomností AgNPs (c).

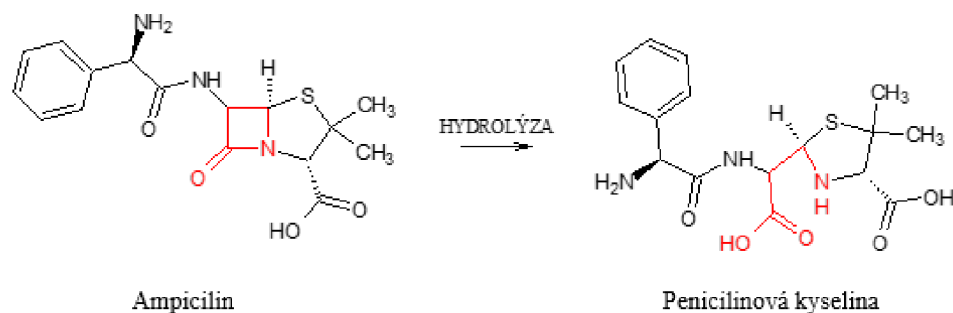
Dále bylo zkoumáno, zda je možné na zlatém komerčním substrátu s přítomností AgNPs (54 mg/L) ve vzorku naměřit signál ampicilinu i při jeho nižších koncentracích. Ze zásobního roztoku ampicilinu (1000 mg/L) byly připraveny vzorky, které se lišily koncentrací ampicilinu a to následně: 500; 250; 125; 50; 5 a 0,5 mg/L. Získaná spektra jsou vyobrazena na Obrázek 29. Nejnižší koncentrací ampicilinu, která se nám podařila ještě detekovat, byla $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L.



Obrázek 29. SERS spektra pro vzorky s různou koncentrací ampicilinu v přítomnosti 54 mg/L AgNPs.

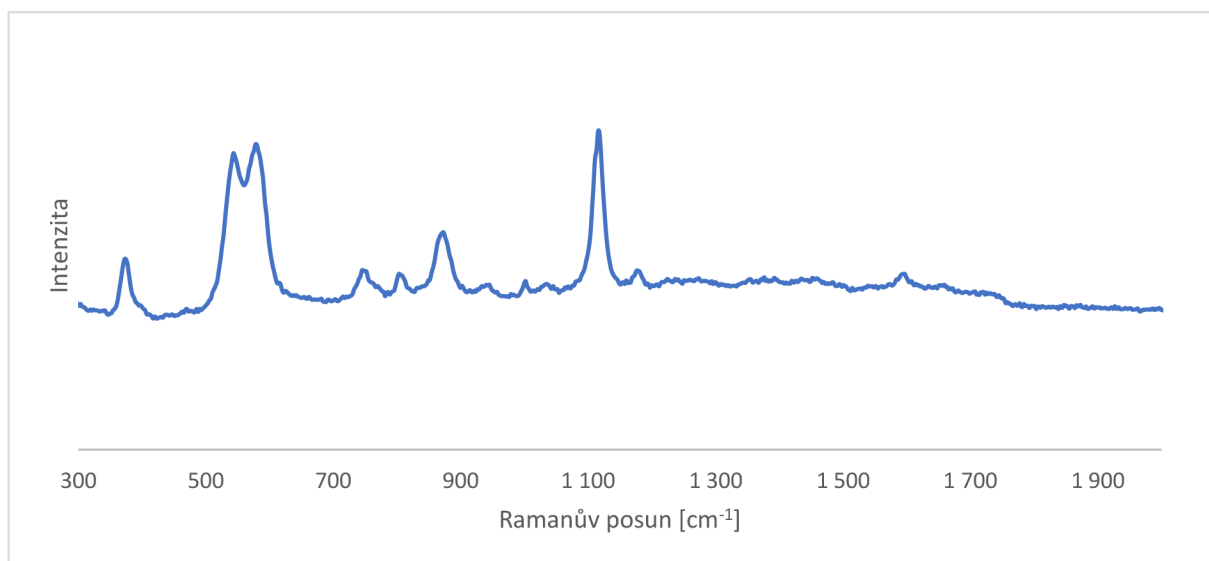
3.2 Detekce změn ve spektrech ampicilinu

V předchozí kapitole bylo zjištěno, že pomocí SERS metody lze detekovat AMP, a to i ve velmi nízkých koncentracích (Obrázek 29). Dalším ze stanovených cílů bylo zjistit, zda je možné pomocí stejné metody detekovat změny ve spektru ampicilinu. Bylo rozhodnuto, že tyto změny se budou pozorovat na základě hydrolyzy ampicilinu, kde je známo, že při jeho hydrolyze dochází k otevírání β -laktamového kruhu za vzniku penicilinové kyseliny (Obrázek 30). Spektrum kyseliny penicilinové se vyznačuje píky v oblastech 372, 550, 766, 882 a 1112 cm^{-1} (75). Tyto píky odpovídají vibracím COO- skupin, které vznikají při otevírání β -laktamového kruhu (75). Jedním z důvodů sledování změn ve spektru v důsledku hydrolyzy je fakt, že právě hydrolyza β -laktamových antibiotik, mezi které ampicilin patří, popisuje jeden z hlavních mechanismů resistance bakterií vůči těmto antibiotikům. Bakterie produkují betalaktamázy – enzymy, které katalyzují rozklad β -laktamových antibiotik, tedy jejich změnu struktury, jež bychom měli být schopni detekovat v rámci povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie.



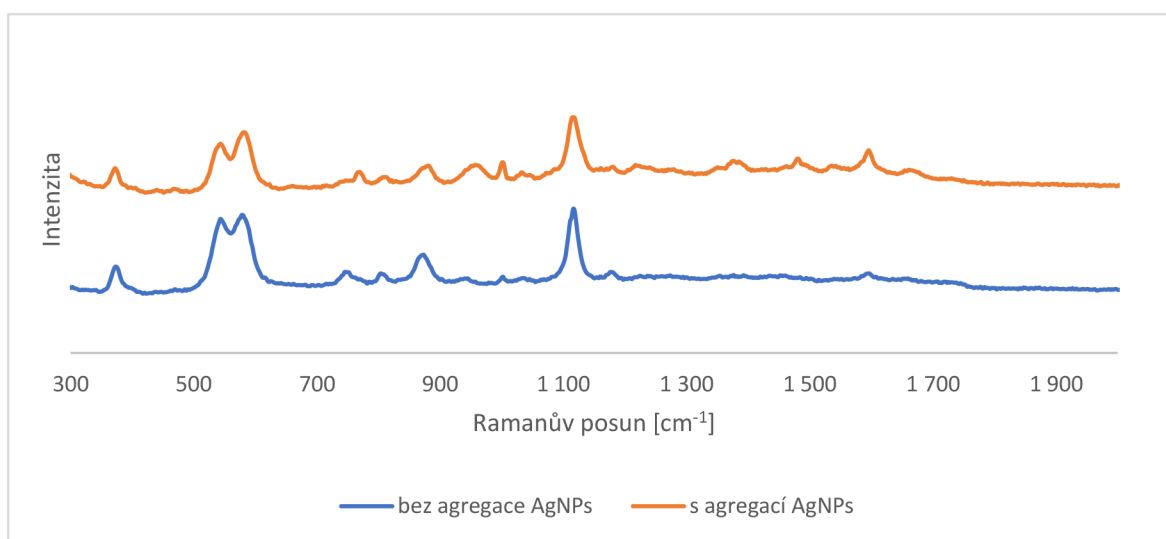
Obrázek 30. Schéma hydrolyzy ampicilinu za vzniku kyseliny penicilinové.

V rámci této práce byla prováděna hydrolyza ampicilinu (1000 mg/L) pomocí kyseliny chlorovodíkové (0,01 mol/L). Hydrolyza probíhala za stálého míchání, přes noc při 37 °C. Druhý den byla proměřena SERS spektra vzorků na zlatém substrátu s přidavkem nanočástic stříbra a ta ukázala úspěšně proběhlou hydrolyzu ampicilinu na kyselinu penicilinovou (Obrázek 31). Došlo k objevení píků v oblastech 372, 550, 766, 882 a 1112 cm^{-1} , jež jsou pro kyselinu penicilinovou charakteristické (viz výše).



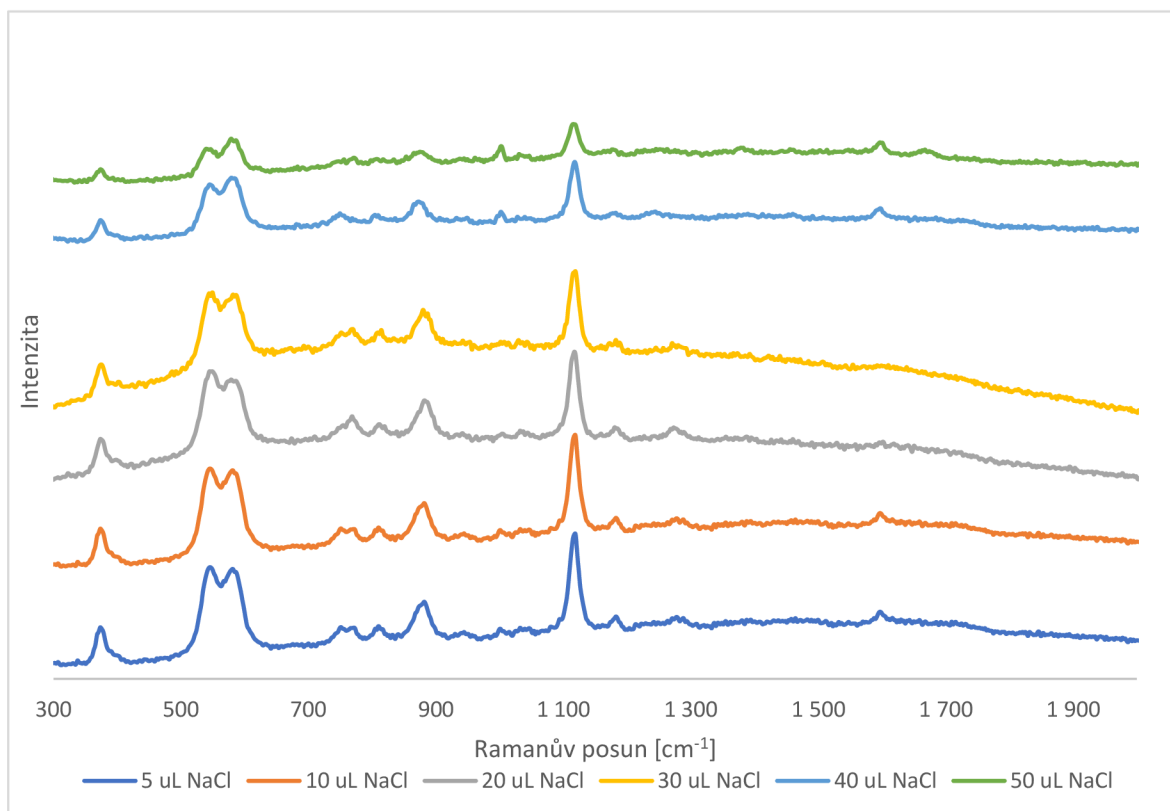
Obrázek 31. SERS spektrum kyseliny penicilinové vzniklé hydrolyzou ampicilinu.

V rámci optimalizace výsledků měření bylo zjištěno, že lepších výsledků, tedy výrazného zesílení, je dosaženo při měření signálu v blízkosti agregovaných částic, které byly agregovány v důsledku přidání roztoku chloridu sodného (Obrázek 32), a to i přes to, že je antibiotikum v důsledku přidání 20 μL 0,4 mol/L NaCl lehce naředěno (416,7 mg/L). Mezi částicemi však v tomto případě nejspíše dochází ke vzniku tzv. hot spots, což jsou nanometrické mezery mezi nanočásticemi nebo jejich ostré hrany, kde dochází k zakoncentrování elektrického pole, které je způsobeno lokálními povrchovými plasmony a při měření signálu analytu v těchto oblastech dochází pak k markantnímu zesílení signálu (17). Dle získaných spekter (Obrázek 32) lze vidět, že agregované částice zesilují signál, hlavně těch menších píků, které byly získány ze vzorku bez agregace (např. píky 1600 a 1000 cm^{-1}).



Obrázek 32. SERS spektrum pro kyselinu penicilinovou s neagregovanými a agregovanými AgNPs.

V následujících experimentech byly tedy nanočástice vždy agregovány přidavkem NaCl, jehož koncentrace byla optimalizována v rámci následujícího experimentu, kde byla měřena závislost intenzity signálu na přidaném objemu roztoku NaCl (0,4 mol/L), přičemž přidávané objemy byly následující: 5, 10, 20, 30, 40 a 50 μL (Obrázek 33).



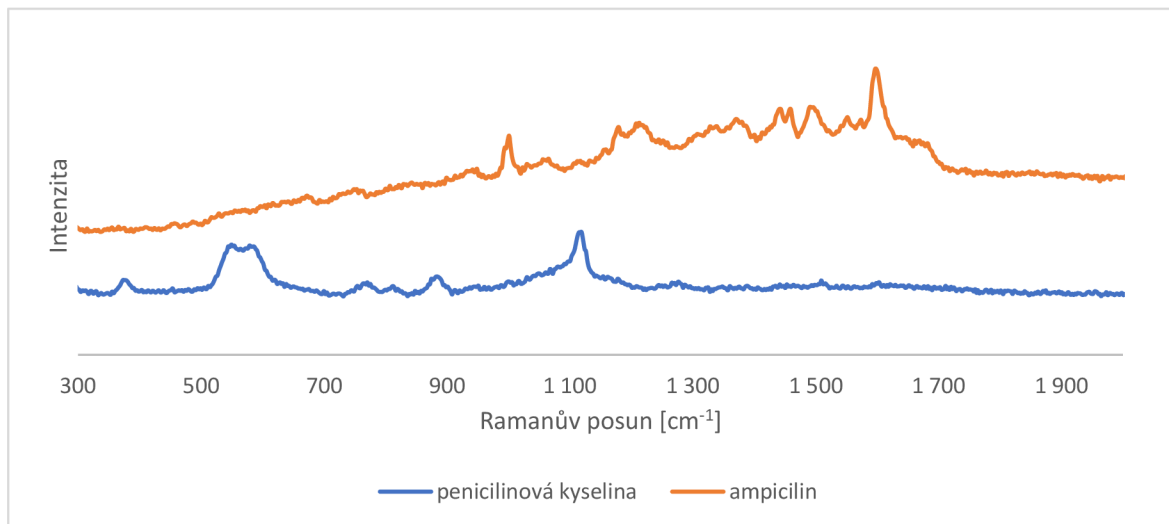
Obrázek 33. SERS spektra kyseliny penicilinové s přítomností agregovaných AgNPs v závislosti na přidávaném objemu 0,4 mol/L NaCl.

S přibývajícím objemem 0,4 mol/L NaCl se snižovala inzenzita naměřených píků. Nejvyšší inzenzita píků byla naměřena v případě využití objemů 5, 10, 20 a 30 μL . Koncentrace 0,01 mol/L NaCl ve vzorku byla tedy stanovena jako ta dostačující a byla dále využívána ve všech následujících měřeních. Výsledné koncentrace NaCl ve vzorku jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2. Přidávané objemy 0,4 mol/L NaCl a jeho výsledné koncentrace ve vzorcích na SERS.

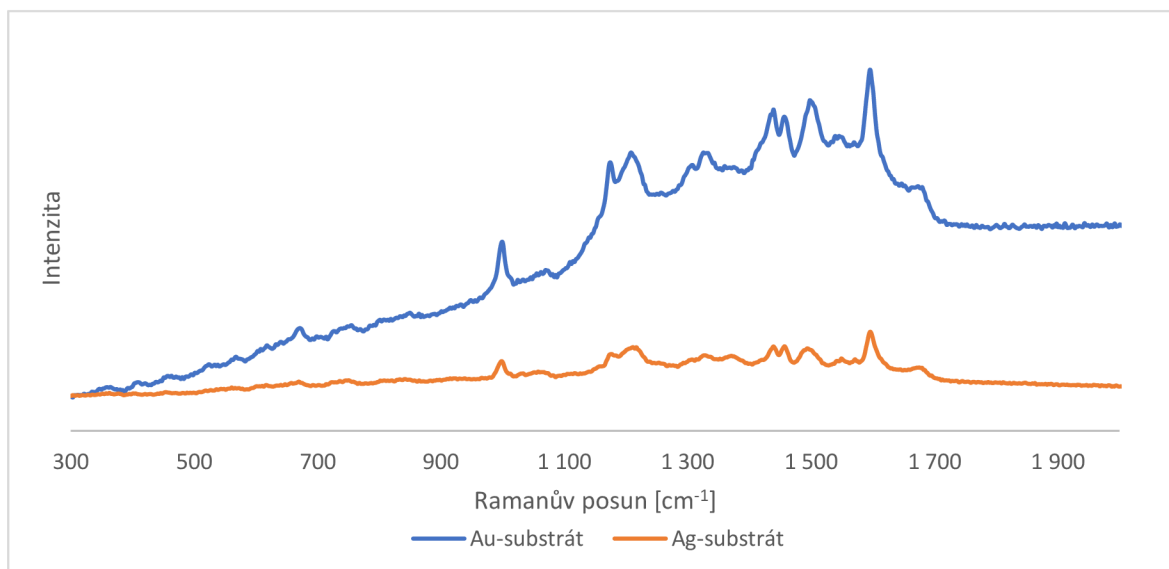
Objem 0,4 mol/L NaCl [μL]	Koncentrace NaCl ve vzorku [mol/L]
5	0,010
10	0,019
20	0,036
30	0,052
40	0,067
50	0,080

V další části této práce bylo výše zmíněné přeměřeno na stříbrném SERS substrátu, jež byl připraven v rámci experimentální části této práce. Stejně jako u zlatého substrátu bylo stejným způsobem rovněž úspěšně naměřeno spektrum pro ampicilin i penicilinovou kyselinu vzniklou hydrolyzou ampicilinu. (Obrázek 34).

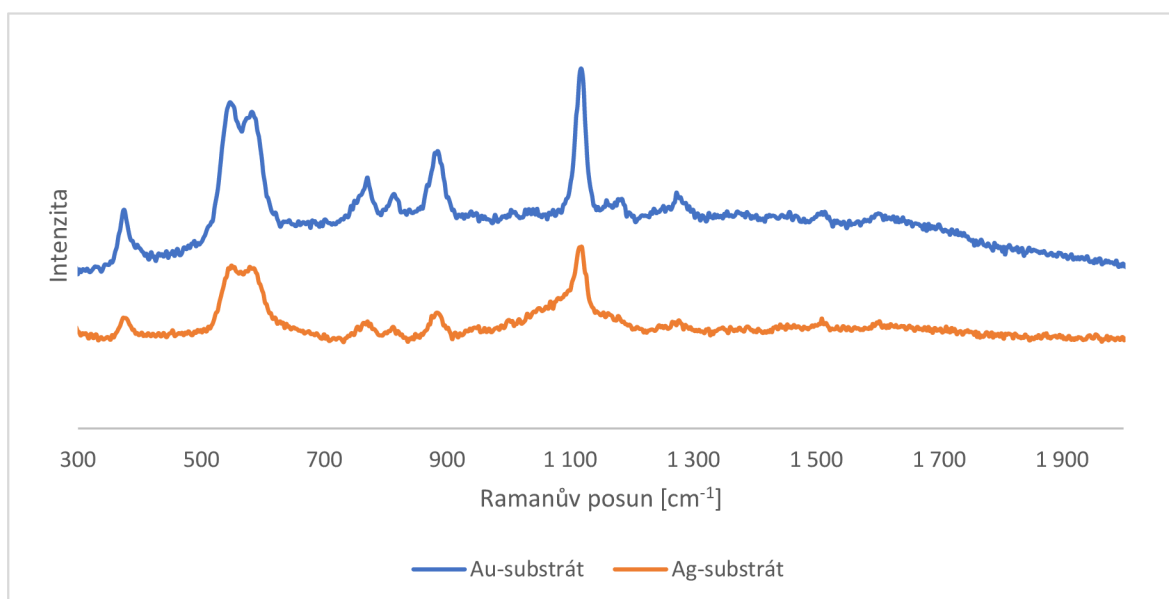


Obrázek 34.. SERS spektra pro penicilinovou kyselinu a ampicilin naměřená na Ag-substrátu.

Na Obrázek 35 a Obrázek 36 je vyobrazen rozdíl naměřených signálů ampicilinu a kyseliny penicilinové na základě použití různých SERS substrátů (komerční zlatý a připravený Ag-substrát). Připravený stříbrný substrát zesiluje signál poměrně dobře, ale musíme konstatovat, že komerční zlatý substrát je na tom o něco lépe.

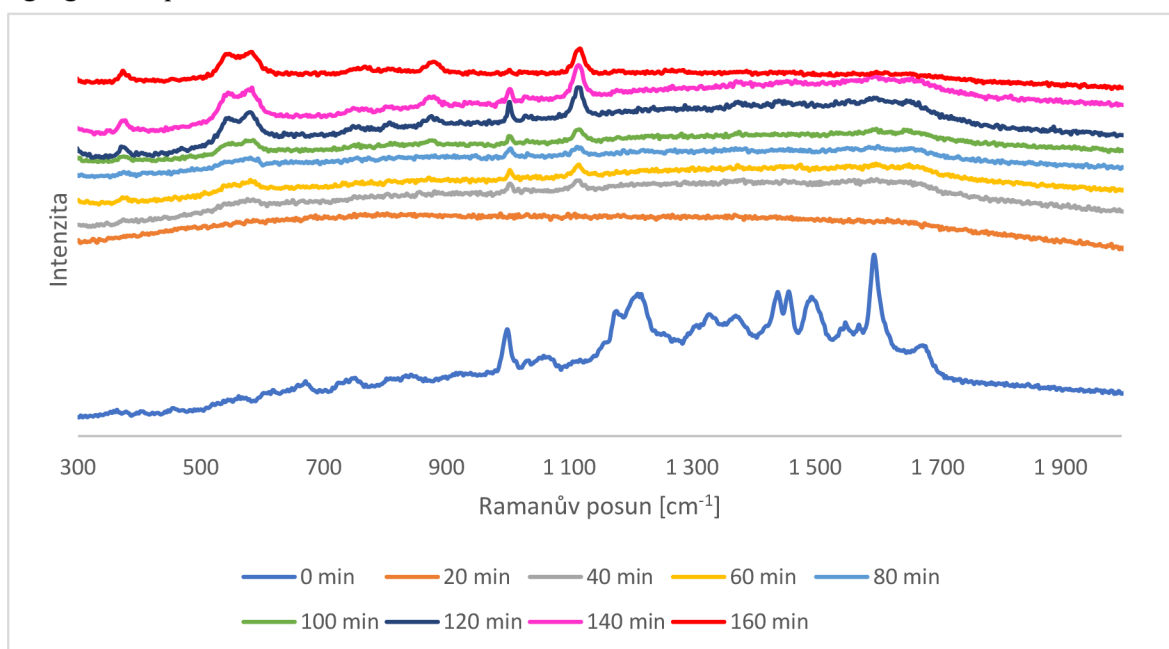


Obrázek 35. SERS spektra ampicilinu získaná měřením na Au-substrátu a Ag-substrátu



Obrázek 36. SERS spektra kyseliny penicilinové získaná při měření na obou substrátech.

Abychom zkrátili dobu potřebnou pro provedení daného experimentu, byla testována kinetika kyselé hydrolyzy ampicilinu bylo zjištěno, jak dlouho je potřeba ampicilin při 37 °C hydrolyzovat, aby byla možná detekce vznikající penicilinové kyseliny. Hydrolyza tedy probíhala opět při 37 °C v termostatu a po každých 20 minutách bylo proměřeno SERS spektrum vzorku. Vzorek byl připraven tak, že se čistý práškový ampicilin rozpustil v 0,1 mol/L HCl, aby výsledná koncentrace ampicilinu byla 1000 mg/L. Na SERS byl pak měřen vzorek, který obsahoval 500 mg/L ampicilinu a 54 mg/L AgNPs, které byly agregované přidavkem NaCl.



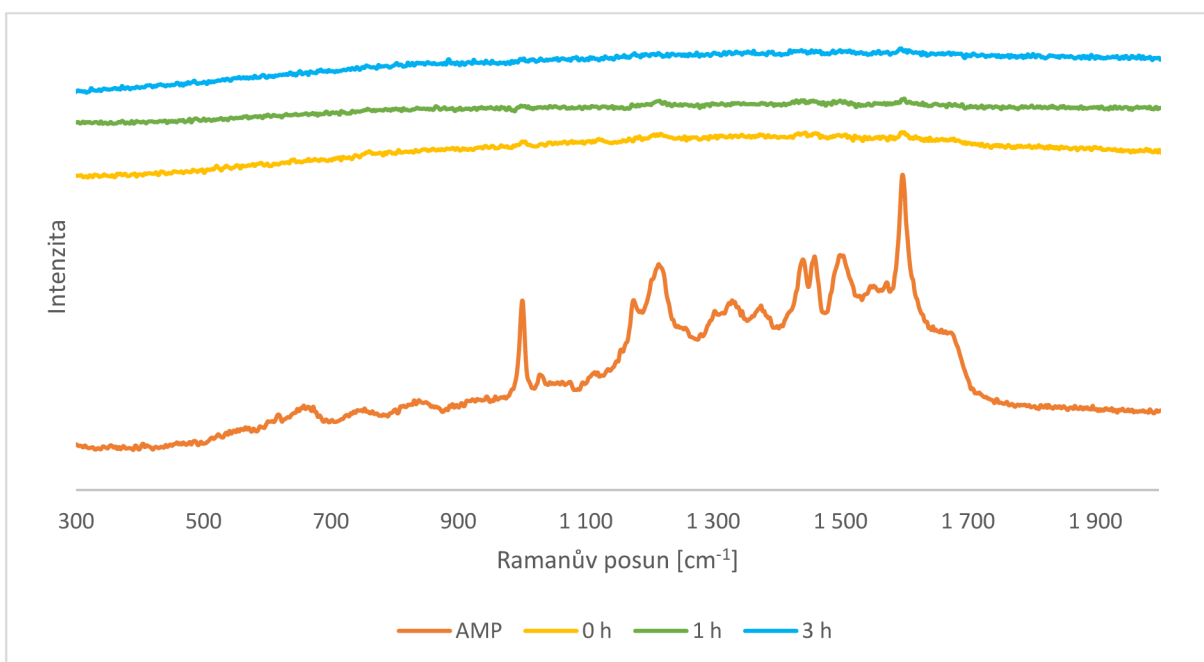
Obrázek 37. SERS spektra pro měření kinetiky hydrolyzy ampicilinu na komerčním zlatém substrátu.

V prvních třiceti minutách nebyla na Au-substrátu detekována žádná změna ve spektru (Obrázek 37). V 50. minutě hydrolyzy se už začaly objevovat náznaky píků pro kyselinu penicilinovou ($372, 550, 882$ a 1112 cm^{-1}), jasná detekce kyseliny penicilinové ve vzorku se objevila až při 120 minutě hydrolyzy.

Na obou testovaných substrátech bylo tedy možné detekovat samotný ampicilin, a dokonce i jeho změny ve spektru při kyselé hydrolyze pomocí $0,1 \text{ mol/L HCl}$, která v laboratoři simulovala rozpad betalaktamového kruhu, ke kterému dochází při reakci ampicilinu s betalaktamázi, reprezentující velmi častý mechanismus rezistence bakterií vůči penicilinovým antibiotikům.

Aby byl náš výzkum posunut o krok dál k využití této metody v klinické praxi, tak bylo testováno štěpení antibiotika (ampicilinu) a jeho změny struktury po přidavku komerčních β -laktamáz izolovaných z kmene *Bacillus cereus* 569/H9 (Sigma Aldrich).

Měření bylo provedeno na zlatém substrátu s agregovanými nanočásticemi pomocí přidavku NaCl. V případě prvního experimentu byla koncentrace enzymu ve vzorku $5\text{U}/230\mu\text{L}$. Na Obrázek 38 jsou vyobrazena získaná spektra, která jsou s výjimkou ampicilinu bez přidavku enzymu výrazně zašuměná. V závislosti na čase (ihned po smíchání – 0 h, 1 h, 3 h) můžeme pozorovat ubývající signál pro píky, které signalizují přítomnost ampicilinu (1000 a 1600 cm^{-1}). V konečném případě se však ale neukázaly píky pro kyselinu penicilinovou, takže nelze říci, zda tam vůbec vzniká.



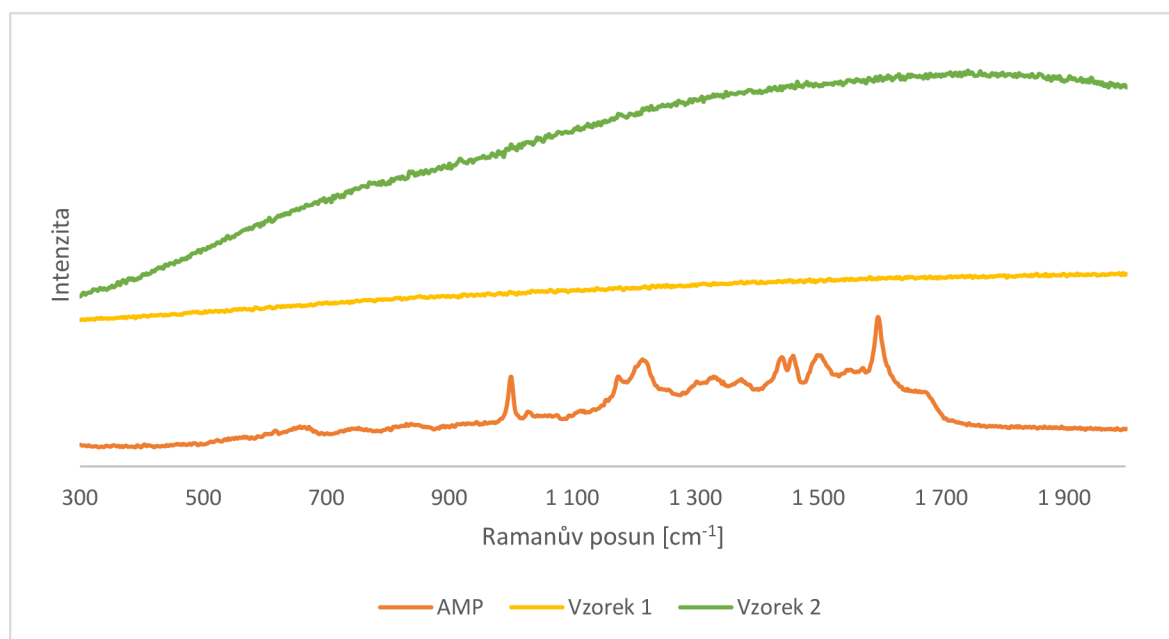
Obrázek 38. SERS spektra pro ampicilin a pro jeho hydrolyzovaný produkt po hydrolyze komerčně dostupnou β -laktamázou (enzymem).

Je nutno podotknout, že při přípravě vzorku bylo pozorováno, že v přítomnosti enzymu se nanočástice moc dobře neagregují. Zbarvení disperze zůstalo stejné. Je tedy možné, že přítomnost enzymu ovlivňuje stabilitu AgNPs, tím není zaručený dostatečný vznik hot spots, které mají značný vliv na detekci pomocí SERS metody. Navíc samotná kyselina penicilinová nese záporný náboj, což je souhlasný náboj jako mají AgNPs (-39,4 mV) a je možné, že se navzájem odpuzují a molekuly analyzované kyseliny penicilinové se tím pádem nepřibližují k povrchu nanočástic, které značně signál zesilují. Jednou z dalších možností neúspěšné identifikace může být pH vzorku, které se může lišit od hodnoty pH izoelektrického bodu ampicilinu.

S ohledem na izoelektrický bod (hodnota pH, při které je náboj molekuly nulový) ampicilinu (5,5) byl vzorek lehce okyselen pomocí 0,1 mol/L HCl a po hodinové inkubaci při 37 °C bylo přeměřeno spektrum (Obrázek 39). Snížením pH by látka měla získat lehce kladný náboj a tím pádem by mohla lépe interagovat s povrchem nanočástice a zesilovat tak její signál. Proto byly zhotoveny vzorky dle následující tabulky (Tabulka 3). Látky byly přidávány v pořadí, v jakém jsou uvedené v Tabulka 3.

Tabulka 3. Objemy jednotlivých látek pro přípravu okyselených vzorků.

Vzorek	AMP (1000 mg/L)	Enzym	HCl (0,1 mol/L)	AgNPs (108 mg/L)	NaCl (0,4 mol/L)
1	100 uL	5 uL	5 uL	100 uL	5 uL
2	5 uL	5 uL	1 uL	5 uL	5 uL



Obrázek 39. SERS spektra vzorku ampicilinu a jeho hydrolyzovaného produktu po uskutečněné hydrolyzy enzymem v případě okyselených vzorků.

Dle získaných spekter lze vyvodit, že sice píky symbolizující ampicilin zmizely, ale nedošlo k detekci piků pro kyselinu penicilinovou, prakticky nebylo možné pozorovat žádné píky, což může značit fakt, že pro detekci analytu nejsou částice správně funkcionalizovány a nemohou tak adekvátně interagovat s analytem a zesilovat jeho signál.

S ohledem na získané výsledky je nutno říci, že do budoucna bude potřeba systém nadále optimalizovat tak, aby bylo zajištěno dostatečné množství enzymu potřebné k rozštěpení antibiotika, navázání vznikající látky na povrch nanočástic pro zajištění blízkosti analytu (v tuto chvíli zde hrají roli spíše odpudivé interakce), tvorbu hot spotů a tím tak dostatečné zesílení signálu. Možnými problémovými pilíři zde tedy může být například složení enzymu (stabilizace částic), hodnota pH v izoelektrickém bod, náboj a další charakteristiky, kterým bude pozornost věnována v návazné diplomové práci.

3.3 Testování bakteriální rezistence k ampicilinu

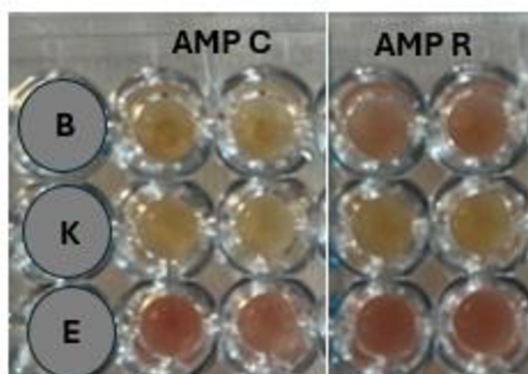
S ohledem na to, že bychom do budoucna rádi využili výše popsaného systému k rozlišení mezi citlivou a rezistentní bakterií, byly vybrány dva bakteriální kmeny (*E. coli* CCM 3954, *E. coli* CCM 4225), jež se liší svojí citlivostí k ampicilinu a byla na nich provedena základní mikrobiologická testování. Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC), pomocí které lze mimo jiné stanovit i citlivost bakterií. U rezistentního kmene byla pak potvrzena i produkce bakteriálních enzymů, jež negativně ovlivňují účinnost antibiotika.

Stanovení MIC je v současné době zdoluhavý proces, který by mohl být za použití Ramanovy spektroskopie do budoucna urychlen. Pro stanovení MIC (Tabulka 4) bylo v našem případě využito mikrodiluční metody a dvou vzorků antibiotik, a to ampicilinu (AMP) a ampicilinu se sulbactamem (AMS). Sulbactam je strukturně podobný betalaktamům a betalaktamázy k nim mají vyšší afinitu. Tím pádem je sulbactam štěpen přednostně, ampicilin tedy nepodléhá strukturním změnám a může tak působit i proti rezistentním bakteriálním kmenům produkujícím β -laktamázy. Hodnota BP (breakpoint) udává maximální koncentraci antibiotika, při které jsou bakterie k účinkům antibiotik ještě citlivé. V případě ampicilinu a bakteriálního kmene *E. coli* je breakpoint 8 mg/L, u kmene *E. coli* CCM 3954 byla MIC stanovena na 4 mg/L, bakterie jsou tedy účinkům ampicilinu citlivé, přičemž MIC u *E. coli* CCM 4225 byla větší než 64 mg/L, bakterie jsou tedy rezistentní. V případě kombinace ampicilinu se sulbactamem (4 mg/L) se MIC snížila zpět na 8 mg/L a bakterie se tak stala opět citlivou.

Tabulka 4. Hodnoty MIC, BP, ampicilinu (AMP) a ampicilin-sulbactamu (AMS) pro kmeny *E. coli*.

MIC [mg/L]	AMP	AMS
BP	8	8
3954	4	4
4225	>64 R	8

Kmen *E. coli* CCM 3954 je vůči β -laktamovým antibiotikům citlivý, lze ho tedy bez problému pomocí ampicilinu léčit, avšak kmen *E. coli* CCM 4225 je naopak vůči těmto antibiotikům rezistentní a bakterie jsou vůči účinku ampicilinu imunní. Produkce β -laktamáz u námi vybraných bakteriálních kmenů byla experimentálně ověřena pomocí nitrocefínového testu, u něž při pozitivním průkazu β -laktamázy dochází k červenému zbarvení (Obrázek 40). Z výsledku lze vyvodit, že námi vybraný bakteriální kmen *E. coli* CCM 3954 neprodukuje β -laktamázy (žluté zbarvení). Tím se potvrdilo, že tento kmen není vůči antibiotikům rezistentní. Červené zbarvení bylo pozorováno v řádku E (komerčně dostupný enzym) a také u bakterie (B) v přítomnosti ampicilin rezistentního kmene *E. coli* CCM 4225 (AMP R), což potvrzuje produkci β -laktamáz jako mechanismus rezistence u námi vybraného sbírkového kmene, kde byl tento mechanismus rezistence již dříve popsán.



Obrázek 40. Jamky po 24hodinové kultivaci a s přidaným nitrocefínem (AMPC = *E. coli* CCM 3954, AMPR = *E. coli* CCM 4225, řádek B = bakterie s AMP v bujonu, řádek K = kontrolní (AMP v bujonu), řádek E = AMP s enzymem (Sigma Aldrich, 2U/jamka)).

V současné době se jednalo pouze o prvotní experimenty s bakteriemi sloužící k výběru bakteriálního kmene, v našem případě *E. coli*, s rozdílnou citlivostí k ampicilinu, jež pramení právě z produkce bakteriálních β -laktamáz, které štěpí β -laktamový kruh ampicilinu, narušuje jejich strukturu a snižuje tak jejich antibakteriální účinek. V budoucnu by tyto kmeny mohly být použity na další testování v rámci povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, jež by mohla v budoucnu sloužit k urychlení detekce citlivosti bakterií.

4 ZÁVĚR

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo navrhnout SERS-aktivní substrát a optimalizovat jeho přípravu tak, aby zesiloval signál β -laktamového antibiotika (ampicilinu) v povrchem-zesílené Ramanově spektroskopii. Navržený SERS substrát se připravoval pomocí metody Layer-by-Layer za účasti anizotropních plasmonických nanočástic stříbra. Proces byl založen na střídavém pokládání vrstev látek o opačném náboji – na elektrostatické interakci mezi nimi. Negativně nabitě nanočástice stříbra byly připraveny dvoustupňovou redukcí amoniakálního komplexu se stříbrem za pomoci dvou redukčních činidel – tetrahydridoboritanu sodného a hydrazin hydrátu. Pro nanosení finální vrstvy nanočástic byly testovány dva různé kladně nabitě polymery – chitosan a poly(diallyldimethylamoniumchlorid) (PDDA). U těchto polymerů se zkoumalo, jaká koncentrace bude pro přípravu nejvhodnější, ale vůbec, který z nich bude obecně tvořit lepší vrstvy. V rámci optimalizace substrátu byla také zkoumána stabilizace vrstev pomocí želatiny a rozdíl mezi jednovrstevným a dvouvrstevným substrátem. Pro prvotní experimenty pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byl vybrán jednovrstevný substrát připravený s využitím 1% PDDA a stabilizovaný vrstvou želatiny. Další slibné substráty budou testovány a následné optimalizace budou prováděny v rámci navazujícího výzkumu.

V dalším kroku byl připravený Ag-substrát testován pomocí techniky SERS pro citlivou detekci β -laktamového antibiotika (ampicilinu). Jelikož substrát signál antibiotika velmi dobře zesiloval, bylo zkoumáno, zda je pomocí této techniky možné detekovat i změny ve struktuře antibiotika, ke které v praxi dochází po interakci antibiotika s rezistentními bakteriemi produkující β -laktamázy. Tyto enzymy hydrolyzují β -laktamový kruh antibiotika, tím pádem dochází ke změně jeho struktury a antibiotikum ztrácí svoji účinnost.

Změna struktury antibiotika byla v rámci této práce úspěšně simulována hydrolyzou antibiotika v kyselém prostředí. Strukturní změna byla také testována za použití komerčně dostupného enzymu izolovaného z rezistentní bakterie, dosud ale neúspěšně. Modifikace tohoto experimentu a další přesun k mikrobiologickým vzorkům bude tedy prováděn až v rámci diplomové práce. Vznik a šíření bakteriální rezistence je v současnosti velký klinický problém. Detekce změny struktury antibiotika by do budoucna mohla nahradit velmi zdlouhavé fenotypické testování a výrazně tak urychlit rozlišení mezi citlivou a rezistentní bakterií, a tím pádem zajistit rychlou administraci vhodného antibiotika.

CONCLUSION

One of the objectives of this bachelor thesis was to design a SERS-active substrate and to optimize its preparation to enhance the signal of a β -lactam antibiotic (ampicillin) in surface-enhanced Raman spectroscopy. The designed SERS substrate was prepared using a Layer-by-Layer method utilizing anisotropic plasmonic silver nanoparticles. The process was based on the sequential deposition of layers comprising substances of opposing charge, leveraging their electrostatic interaction. The negatively charged silver nanoparticles were synthesized by a two-step reduction of an ammonia-silver complex using sodium tetrahydridoborate and hydrazine hydrate as reducing agents. Two different positively charged polymers, chitosan and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA), were evaluated for the deposition of the final layer of nanoparticles. For these polymers, it was investigated which concentration would be most suitable for the preparation, but in general which one would form better layers. Additionally, the stabilization of the layers using gelatine and the difference between single and double layered substrates were also investigated. For initial experiments using surface-enhanced Raman spectroscopy, a monolayer substrate prepared with 1% PDDA and stabilized with gelatine layer was selected as the preferred option. Other promising substrates will be tested, and subsequent optimizations will be performed as part of follow-up research.

In the next step, the prepared Ag-substrate was tested using SERS technique to achieve sensitive detection of β -lactam antibiotic (ampicillin). Since the substrate amplified the signal of the antibiotic very well, it was investigated whether this technique can also detect changes in the structure of the antibiotic. Such alterations commonly occur following interactions between the antibiotic and β -lactamase-producing bacteria, where the enzymes catalyse the hydrolysis of the antibiotic's β -lactam ring, thereby becoming ineffective.

The change in the structure of the antibiotic was successfully simulated by hydrolysis of the antibiotic in an acidic environment in this work. The structural change has also been tested using a commercially available enzyme isolated from a resistant bacterium, but so far not successfully. Therefore, modification of this experiment and subsequent transition towards microbiological samples will be carried out within the framework of diploma theses. The emergence and spread of bacterial resistance is currently a major clinical problem. In the future, the detection of a change in the structure of an antibiotic could replace the very lengthy phenotypic testing and thus significantly accelerate the differentiation between

sensitive and resistant bacteria and thus ensure rapid administration of the appropriate antibiotic.

REFERENCE

1. RAMAN, C., KRISHNAN, K. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 1928, 121, stránky 501-502.
2. M.fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical physics letters*. 27. February 1974, Sv. 26, 2.
3. Serebrennikova, K.V., a další. Raman Scattering-Based Biosensing: New Prospects and Opportunities. *Biosensors*. 2021, 11, str. 512.
4. Ewen Smith, Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester, England : John Wiley & Sons, Ltd, 2005. ISBN-13 978-0-471-49794-3.
5. Blackie, Evan J., Le Ru, Eric C. a Etchegoin, Pablo G. Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, Sv. 131, 40.
6. John C. Lindon, George E. Tranter, David W. Koppenaal. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 2. Buflington, USA : Elsevier Ltd., 2010. stránky 2413-2419, 2804-2812, 2822-2827. Sv. 3. ISBN 978-0-12-374417-3.
7. António, Maria, a další. Functionalized Gold Nanoparticles for the Detection of C-Reactive Protein. *Nanomaterials*. 2018, Sv. 8, 200.
8. John R. Ferraro, Kazuo Nakamoto, Chris W. Brown. *Introductory Raman Spectroscopy*. 2. Orlando, USA : Elsevier Science, 2003. stránky 161-167. ISBN 978-0-12-254105-6.
9. Mulvihill, Martin J., a další. Anisotropic Etching of Silver Nanoparticles for Plasmonic Structures Capable of Single-Particle SERS. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, Sv. 132.
10. Link, Stephan a El-Sayed, Mostafa A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry*. 1999, Sv. 103, 40, stránky 8410-8426.
11. Malama Chisanga, Howbeer Muhamadali, David I. Ellis & Royston Goodacre. Enhancing Disease Diagnosis: Biochemical Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Applied Sciences*. 2019, 9, str. 1163.
12. Gracie, K., a další. Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chemical Science*. 2014, 5, stránky 1030-1040.
13. Xu, L.J., a další. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy detection of DNA with single-base sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, Sv. 137, 15, stránky 5149-5154.

14. Bhavya Sharma, Renee R. Frontiera, Anne-Isabelle Henry, Emilie Ringe, Richard P. Van Duyne. SERS: Materials, applications and the future. *Materials Today*. 2012, Sv. 15, 1-2, stránky 16-25.
15. Alisher Sultangaziyev, Aisha Ilyas, Aigerim Dyussupova and Rostislav Bukasov. Trends in Application of SERS Substrates beyond Ag and Au, and Their Role in Bioanalysis. *Biosensors*. 2022, Sv. 12, 11, str. 967.
16. Sara Abalde-Cela, Paula Aldeanueva-Potel, Cintia Mateo-Mateo, Laura Rodríguez-Lorenzo, Ramón A. Alvarez-Puebla and Luis M. Liz-Marzán. Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. *J. R. Soc. Interface*. 2010, 7, stránky 435-450.
17. Willets, Katherine A. Super-resolution imaging of SERS hot spots. *Chem. Soc. Rev.* 2013, Sv. 00, stránky 1-11.
18. Kouba, Karel. 8. Studentská vědecká konference fyziky pevných látek a materiálů - SSCSSMP-8 (2018). *Katedra inženýrství pevných látek*. [Online] 17-21. Zář 2018. [Citace: 24. Únor 2024.] <https://kiplweb.fjfi.cvut.cz/files/SSCSSPM8-2018-sbornik.pdf>. ISBN 978-80-01-06511-2.
19. Tran Thi Kim Chi, Nguyen Thi Le, Bui Thi Thu Hien, Dang Quoc Trung and Nguyen Quang Liem. Preparation of SERS substrates for the detection of organic molecules at low concentration. *Communications in Physics*. 2016, Sv. 26, 3, stránky 261-268.
20. Pavelka, Vít. Archiv závěrečné práce Vít Pavelka PřF N-CH FCHE, učo 408930. *Informační systém Masarykovy univerzity*. [Online] 20. Červen 2017. [Citace: 26. Únor 2024.] <https://is.muni.cz/th/ecdxz/>.
21. Yang S, Lapsley MI, Cao B, Zhao C, Zhao Y, Hao Q, Kiraly B, Scott J, Li W, Wang L, Lei Y, Huang TJ. Large-Scale Fabrication of Three-Dimensional Surface Patterns Using Template-Defined Electrochemical Deposition. *Advanced Functional Materials*. 2013, Sv. 11, 23(6), stránky 720-730.
22. Stephen Y. Chou, Peter R. Krauss and Preston J. Renstrom. Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Appl. Phys. Lett.* 1995, Sv. 67, 21.
23. Schwartz, Daniel K. Langmuir-Blogett film structure. *Surface Science Reports*. 1997, Sv. 27, 7-8.
24. Gudmundsson, J. T. Physics and technology of magnetron sputtering discharges. *Plasma Sources Science and Technology*. 2020, 29.

25. Dahlia Alkekhia, Paula T. Hammond and Anita Shukla. Layer-by-Layer Biomaterials for Drug Delivery. *Annual Reviews*. 2020, 22, stránky 1-24.
26. Joseph J. Richardson, Jiwei Cui, Mattias Björnmalm, Julia A. Braunger, Hirotaka Ejima and Frank Caruso. Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chemical Reviews*. 2016, 116, stránky 14828-14867.
27. Iler, R. K. Multilayers of colloidal particles. *Journal of colloid and interface science*. 1966, 21, stránky 569-594.
28. Libor Kvítek, Aleš Panáček, Jana Soukupová a Radek Zbořil. Nanotechnologie a jejich praktické aplikace. [autor knihy] Kolektiv autorů. [editor] Jana Kreiselová Tomáš Opatrný. *Zařazení moderních přírodovědných poznatků do výuky na SŠ a ZŠ*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2006, 6, stránky 69-80.
29. Edwards, Steven A. *The Nanotech Pioneers*. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. ISBN 3-527-31290-0.
30. Scardaci, Vittorio. Anisotropic Silver Nanomaterials by Photochemical Reactions: Synthesis and Applications. *Nanomaterials*. 2021, Sv. 11, 9.
31. Vidyasagar, a další. Green synthesis of silver nanoparticles: methods, biological applications, delivery and toxicity. *Materials Advances*. 2023, Sv. 8, 4.
32. Ganash, Entesar A. Synthesis of silver nanoparticles using pulsed laser ablation in liquid: a review. *Laser Physics Letters*. 2023, 20.
33. S. Iravani, H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi and B. Zolfaghari. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2014, Sv. 9, 6, stránky 385-406.
34. Almatroudi, Ahmad. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sciences*. 2020, 15, stránky 819-839.
35. *Přehled bakterií používaných k přípravě nanočástic kovů*. Čejková, Anna Miškovská a Alena. 115, Praha : Chemické listy, 2021, stránky 422-429.
36. Li Xu, Yi-Yi Wang, Jie Huang, Chun-Yuan Chen, Zhen-Xing Wang, Hui Xie. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 2020, Sv. 10, 20, stránky 8996-9031.
37. Virender K. Sharma, Ria A. Yngard, Yekaterina Lin. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2008, 145, stránky 83-96.

38. Suchomel, Petr. *Příprava nanočástic stříbra redukcí jeho halogenidů*. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2010.
39. Dragieva, I. D. a Stoynov, Z. B. SYNTHESIS OF NANOPARTICLES BY BOROHYDRIDE REDUCTION AND THEIR APPLICATIONS. *Scripta Materiala*. 2001, Sv. 44, 8-9, stránky 2187-2191.
40. Xia, Younan, a další. Seed-Mediated Growth of Colloidal Metal Nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, Sv. 56, 1, stránky 60-95.
41. Panáček, Aleš, a další. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *The Journal of Physical Chemistry*. 2006, Sv. 110, 33, stránky 16248-16253.
42. Slepíčka, Petr, a další. Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation. *Materials*. 2020, Sv. 13, 1.
43. Mandic-Rajcevic, Stefan, a další. Exposure duration and absorbed dose assessment in pesticide-exposed agricultural workers: Implications for risk assessment and modeling. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2019, Sv. 222, 3, stránky 494-502.
44. Li, Dan, a další. Headspace-Sampling Paper-Based Analytical Device for Colorimetric/Surface-Enhanced Raman Scattering Dual Sensing of Sulfur Dioxide in Wine. *Analytical Chemistry*. 2018, Sv. 90, 9, stránky 5719-5727.
45. Yunfan Chen, Qi An, Kaixuan Teng, Chao Liu, Fuwei Sun and Guangtao Li. Applications of SERS in In-Vitro Biomedical Detection. *Chem. Asian J.* 2023, 18.
46. Peng, Ran, a další. Recent Development and Applications of Stretchable SERS Substrates. *Nanomaterials*. 2023, Sv. 13, 22.
47. Kumar, Samir, a další. A facile method for fabrication of buckled PDMS silver nanorod arrays as active 3D SERS cages for bacterial sensing. *Chem. Comm.* 2015, 51.
48. Dina, Nicoleta Elena, a další. SERS-based antibiotic susceptibility testing: Towards point-of-care clinical diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*. 2023, Sv. 219.
49. Chisanga, M., a další. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) in Microbiology: Illumination and Enhancement of the Microbial World. *Applied Spectroscopy*. 2018, Sv. 72, 7.
50. Sultan, Insha, a další. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *frontiers in Microbiology*. 2018, Sv. 9, 2066.

51. Goudarzi, Mehdi a Navidinia, Masoumeh. Overview Perspective of Bacterial Strategies of Resistance to Biocides and Antibiotics. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2019, Sv. 14, 2.
52. Sengupta, Saswati, Chattopadhyay, Madhad K. a Grossart, Hans-Peter. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *frontiers in Microbiology*. 2013, Sv. 4, 47.
53. Bi, Dexi, a další. Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a resistance-disarmed model organism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015, 70.
54. Liu, Yi-Yun, a další. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016, Sv. 16, 2.
55. Walsh, Timothy R. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010, Sv. 36, 3.
56. Qin, Wenling, Panunzio, Mauro a Biondi, Stefano. β -Lactam Antibiotics Renaissance. *Antibiotics*. 2014, Sv. 3, stránky 193-215.
57. Egorov, A. M., Ulyashova, M. M. a Rubtsova, M. Yu. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae*. 2018, Sv. 10, 4.
58. Kong, Kok-Fai, Schneper, Lisa a Mathee, Kalai. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *The Authors Journal Compilation APMIS*. 2010, Sv. 118, 1.
59. Kaushik, Dwarikadhish, a další. Ampicillin: Rise Fall and Resurgence. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014, Sv. 8, 5.
60. Lode, Hartmut M. Rational antibiotic therapy and the position of ampicillin/sulbactam. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008, Sv. 32, stránky 10-28.
61. Aminov, Rustam I. a Mackie, Roderick I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology letters*. 2007, Sv. 271, 2, stránky 147-161.
62. Walsh, Christopher. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000, Sv. 406, stránky 775-781.
63. Frost, Laura S., a další. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 2005, Sv. 3, stránky 722-732.

64. Yamin, D., a další. Current and Future Technologies for the Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Diagnostics*. 2023, Sv. 13, 20.
65. Wiegand, Irith, Hilpert, Kai a Hancock, Robert E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, Sv. 3, stránky 163-175.
66. Tang, Yi-Wei a Stratton, Charles W. *Advanced Techniques in Diagnostics Microbiology*. místo neznámé : Springer, 2006. ISBN 978-3-319-33900-9.
67. van Belkum A, Durand G, Peyret M, Chatellier S, Zambardi G, Schrenzel J, Shortridge D, Engelhardt A, Dunne WM Jr. Rapid clinical bacteriology and its future impact. *Ann Lab Med*. 2013, Sv. 33, 1, stránky 14-27.
68. Doron, Shira a Davidson, Lisa E. Antimicrobial Stewardship. *Mayo Clinic Proceedings*. 2011, Sv. 86, 11, stránky 1113-1123.
69. Frickmann, Hagen, Masanta, Wycliffe Omurwa a Zautner, Andreas E. Emerging Rapid Resistance Testing Methods for Clinical Microbiology Laboratories and Their Potential Impact on Patient Management. *BioMed Research International*. 2014.
70. Wang, Kaidi, a další. Detection and Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Nanomaterials*. 2018, Sv. 8, 10.
71. Vishnyakova, E. A., a další. Synthesis of Anisotropic Silver Nanoparticles and Investigation of Their Sensory Properties. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2012, Sv. 57, 2.
72. Thammawithan, Saengrawee, a další. A Biological Study of Anisotropic Silver Nanoparticles and Their Antimicrobial Application for Topical Use. *Veterinary Sciences*. 2021, Sv. 8, 221.
73. Karn-orachai, Kullavadee a Ngamaroonchote, Aroonsri. A label-free and selective SERS-based sensor for determination of ampicillin contamination in water-using a fabric gold-silver alloy substrate with a handheld Raman spectrometr. *New J. Chem*. 2023, 47.
74. Zhou, Hualan, a další. Detection of benzylpenicillin sodium and ampicillin residue based on flower-like silver nanostructures using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Research on Chemical Intermediates*. 2022, 48.
75. EL-Zahry, Marwa E., a další. Utility of surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) for elucidation and simultaneous determination of some penicilins and penicilloic acid using hydroxylamin silver nanoparticles. *Talanta*. 2015, 144.

76. Rawat, R.S. Dense Plasma Focus - From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology. *Journal of Physics: Conference Series*. 2015, 591.