

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyzikální chemie**



**Studium synergického antibakteriálního efektu  
nanočástic stříbra v kombinaci s antibiotiky vůči  
rezistentním bakteriím**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	Bc. Věra Kohlová
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Materiálová chemie
Forma studia:	prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

**Olomouc 2019**

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Věra Kohlová
Název práce:	Studium synergického antibakteriálního efektu nanočástic stříbra v kombinaci s antibiotiky vůči rezistentním bakteriím
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.
Rok obhajoby:	2019
Abstrakt:	<p>Cílem diplomové práce bylo studium synergického efektu nanočástic stříbra v kombinaci s antibiotiky s různým mechanismem účinku (ceftazidim, gentamicin a ciprofloxacin) vůči rezistentním bakteriím <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Enterobacter kobei</i>. Pro testování antibakteriální aktivity byly použity nanočástice stříbra s různou velikostí (30 nm a 8 nm), AgNO<sub>3</sub> a kompozitní částice kyanografenu s imobilizovanými nanočásticemi stříbra. Antibakteriální aktivita byla testována standardní diluční metodou v Müeller-Hintonově bujONU. Výsledky testování ukázaly závislost synergického efektu na mechanismu působení antibiotika vůči bakterii a současně na mechanismu bakteriální rezistence vůči antibiotiku. Závislost na velikosti částic stříbra nebyla potvrzena.</p>
Klíčová slova:	nanočástice stříbra, antibiotika, bakteriální rezistence, synergie
Počet stran:	53
Jazyk:	Český

## **Bibliographic identification:**

Author: Bc. Věra Kohlová

Title: Study of antibacterial synergistic effect of silver nanoparticles combined with antibiotics against resistant bacteria

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Aleš Panáček, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract: The aim of my diploma thesis was study of synergistic effect of silver nanoparticles in combination with antibiotics with different mechanism of action (ceftazidim, gentamicin and ciprofloxacin) against resistant bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cobei*. For testing the antibacterial activity were used silver nanoparticles with different particles sizes (30 nm and 8 nm), AgNO<sub>3</sub> and nanocomposite cyanographene with immobilized silver nanoparticles (G\_CN/AgNP's). Antibacterial activity was tested using standard microdilution method in Müller-Hinton broth. Results shown a dependence of the synergistic effect on the mechanism of action of the antibiotic against the bacterium as well as the mechanism of bacterial antibiotic resistance. Dependence on size of silver particles wasn't confirmed.

Keywords: silver nanoparticles, antibiotics, bacterial resistance, synergy

Number of pages: 53

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Aleše Panáčka, Ph.D. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím, aby má bakalářská práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 30.4.2019

Věra Kohlová

### *Poděkování*

*Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D za odborné vedení, neocenitelné rady, jeho čas a především trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Renatě Večeřové, Ph.D z Ústavu mikrobiologie LF UP Olomouc za rady v oblasti mikrobiologie, poskytnuté zázemí na testy mikrobiální aktivity, a především za vždy pozitivní přístup.*

*V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Katedře fyzikální chemie PřF UPOL, za poskytnutí prostoru pro vypracování mé práce a Karle Slavičkové, za její ochotu.*

# Obsah

Obsah .....	6
1. Úvod .....	8
2. Teoretická část .....	9
2.1 Disperzní soustavy a jejich dělení.....	9
2.2 Koloidně disperzní soustavy a jejich vlastnosti .....	9
2.2.1 Kinetické vlastnosti.....	10
2.2.2 Optické vlastnosti .....	11
2.2.3 Elektrické vlastnosti.....	12
2.3 Stabilita koloidních částic .....	14
2.4 Nanočástice stříbra.....	16
2.4.1 Syntéza nanočástic stříbra.....	16
2.4.2 Charakteristika a aplikace nanočástic stříbra.....	17
2.4.3 Biologická aktivita nanočástic stříbra.....	19
2.4.4 Cytotoxicita nanočástic stříbra.....	21
2.5 Rezistence bakterií vůči antibiotikům .....	21
2.6 Rezistence bakterií vůči nanočásticím stříbra .....	23
2.7 Mechanismus účinku nanočástic stříbra .....	25
2.8 Přehled testovaných antibiotik .....	26
2.8.1 Gentamicin .....	26
2.8.2 Ceftazidim.....	27
2.8.3 Ciprofloxacin.....	28
2.8.4 Kolistin.....	29
3. Experimentální část.....	31
3.1 Použité chemikálie .....	31
3.2 Experimentální vybavení.....	31
3.3 Syntéza nanočástic stříbra.....	32
3.4 Stanovení antibakteriální aktivity.....	33
3.5 Příprava vzorků pro testování stability koloidu nanočástic stříbra .....	35
4. Výsledky a diskuze.....	36
4.1 Charakterizace nanočástic stříbra a nanokompozitu G_CN/AgNP's .....	36
4.2 Obnovení účinku antibiotik vůči kmeni <i>Escherichia coli</i> ESBL .....	38
4.3 Obnovení účinku antibiotik vůči panrezistentnímu kmeni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
4.4 Obnovení účinku kolistinu a nanočástic stříbra vůči kmeni <i>Enterobacter kobei</i> .....	43

5. Závěr .....	46
6. Summary .....	47
7. Reference .....	48
8. Seznam zkratk .....	53

# 1. Úvod

V minulém století došlo k významnému rozvoji nanotechnologií v oblastech chemie, fyziky a medicíny, a to zejména díky svým unikátním vlastnostem. Středem zájmu jsou zejména kovové nanočástice ušlechtilých kovů, respektive nanočástice stříbra. A to nejen díky snadné přípravě a širokému uplatnění, ale také kvůli antibakteriálním účinkům při velmi nízkých koncentracích. Nanočástice stříbra našly uplatnění nejen jako substrát pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii, příměs do elektronických součástek, ale zejména v medicíně a farmacii jako například zdravotnické pomůcky, baktericidní povrchy chirurgických nástrojů, sterilní obvazy či krytí ran, antibakteriální ponožky aj.

Stříbro a jeho sloučeniny jsou používány pro své antibakteriální vlastnosti už od středověku. Především byly používány stříbrné nádoby na vodu k zabránění šíření infekcí, později se ze stříbra vyráběli nádoby na potraviny, poháry, přístroje a mísy. V Americe byly vkládány předměty ze stříbra do vody či do mléka pro uchování čerstvosti. V kovové formě je stříbro špatně biologicky rozložitelné, a proto docházelo k výskytu otrav ze stříbra tzv. argyrii. Na začátku 20. století, kdy Alexander Fleming objevil penicilin, dochází k nahrazování stříbra antibiotiky, která byly hojně využívána až do konce 20. století, kdy došlo k výraznému vzrůstu bakteriální rezistence. Při hledání jiných možností léčby infekcí a překonání bakteriální rezistence se velmi často objevuje kombinace dvou antimikrobiálních látek např. antibiotik a nanočástic stříbra. Při těchto kombinacích dochází k zesílení účinku antibiotika a v některých případech až k obnovení účinnosti dříve rezistentního antibiotika.

Cílem této diplomové práce je studium společného efektu nanočástic stříbra s vybranými antibiotiky vůči rezistentním bakteriím. Z rezistentních bakteriálních kmenů byly vybrány *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter kobei* a k nim odpovídající antibiotika. Testované nanočástice stříbra s různou velikostí částic byly připravené redukcí diaminstříbrného komplexu maltosou a tetrahydridoboritanem sodným, dále byl testovaný nanokompozit kyanografenu s obsahem nanočástic stříbra (G\_CN/AgNP's) a pro porovnání i roztok dusičnanu stříbrného. K testování antibakteriální aktivity byla použita standardní mikrodiluční metoda za použití Müeller-Hintonova bujonu.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Disperzní soustavy a jejich dělení

Disperzní soustavou rozumíme takovou soustavu, která je tvořena disperzní fází (dispersum) a disperzním prostředím (dispergens), kdy disperzní fáze je rovnoměrně rozptýlena v disperzním prostředí. V případě, kdy je disperzní soustava tvořena dvěma složkami o stejné fázi, jde o soustavu homogenní (např. vzduch). Soustava heterogenní je disperzní soustava, tvořená dvěma fázemi (např. olej a voda). Částice této soustavy můžeme pozorovat elektronovým či optickým mikroskopem v závislosti na velikosti částic.<sup>1</sup>

Disperzní soustavy můžeme taktéž dělit dle velikosti částic, tvaru či skupenství disperzní fáze a disperzního prostředí. Podle velikosti částic neboli podle stupně disperzity, dělíme disperzní soustavy do třech skupin. Skupinu s nejmenšími částicemi (do 1 nm) označujeme jako analyticky disperzní soustavy. Jedná se o roztoky nízkomolekulárních látek, kdy disperzní částice je velikostně srovnatelná s disperzním prostředím. Systémy s částicemi většími jak 1  $\mu\text{m}$  jsou označovány jako hrubě disperzní soustavy. Ty lze dále dělit na makrodisperzní a mikrodisperzní. Mezi těmito dvěma soustavami se nachází koloidně disperzní systémy jejichž velikostní hranice se udává od 1 nm do 1  $\mu\text{m}$ .<sup>2,3</sup>

Jedním z dalších dělení soustav je dělení na monodisperzní a polydisperzní systémy. Soustava, která obsahuje disperzní částice pouze o jedné velikosti, se nazývá monodisperzní neboli uniformní. Naopak v polydisperzní soustavě nacházíme částice o různých velikostech a pro charakterizaci této soustavy je nutno použít distribuční funkci vyjádřenou distribuční křivkou.<sup>3</sup>

### 2.2 Koloidně disperzní soustavy a jejich vlastnosti

Koloidní soustavy vynikají především díky svým unikátním fyzikálně chemickým vlastnostem. Tyto vlastnosti jsou způsobené především zvětšujícím se fázovým rozhraním mezi disperzní fází a disperzním prostředím v porovnání s množstvím rozptýlené fáze. Nejzajímavějšími vlastnosti koloidních soustav jsou vlastnosti kinetické, optické a elektrické.

## 2.2.1 Kinetické vlastnosti

Vlivem tepelného pohybu dochází k nárazům koloidních částic do molekul disperzního prostředí. Tento pohyb je nazýván Brownovým pohybem podle R. Browna. Jeho intenzita závisí především na teplotě a na velikosti pohybujících se částic. Se vzrůstající teplotou a zmenšováním částic, roste intenzita Brownova pohybu. Tento pohyb se projevuje jako difúze, při působení gravitace nebo odstředivého pole jako sedimentace a také je příčinou membránových jevů např. osmózy.<sup>3,9</sup>

V důsledku pohybu částic dochází mezi soustavami s rozdílnými koncentracemi (koncentrační gradient) k samovolnému vyrovnávání koncentrací, k difúzi. Difúze probíhá vždy ze soustavy s vyšší koncentrací do soustavy s koncentrací nižší do té doby, než se ustanoví rovnováha. Základním zákonem popisující průchod hmoty ve směru proudění difúze je 1. Fickův zákon.

$$\frac{dn}{dt} = -SD \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

Přičemž S je plocha kolmá ke směru difúze, D je difuzní koeficient,  $dc/dx$  udává koncentrační gradient a  $dn/dt$  látkové množství prostupující látky.<sup>1,3</sup>

Pro difuzní koeficient disperzních částic odvodil A. Einstein vztah  $D = \frac{k_B T}{f_i}$ , kde difuzní koeficient je přímo úměrný teplotě a nepřímo úměrný koeficientu tření,  $k_B$  je zde Boltzmanovou konstantou.<sup>3</sup>

V předchozím případě se předpokládalo, že disperzní systém není ovlivňován žádným silovým polem. V případě působení gravitačního pole na koloidní soustavu dojde k usměrněnému pohybu částic, k sedimentaci, která může vést až k úplnému usazení částic nebo pouze k rovnovážnému rozdělení dle velikosti. Rovnovážná rychlost sedimentace pod vlivem gravitačního pole se vypočítá dle vzorce:

$$v = \frac{2r^2(\rho - \rho_0)g}{9\eta} \quad (2)$$

kde r je poloměr částic,  $\rho$  je jejich hustota částic,  $\rho_0$  je hustota disperzního prostředí, g je gravitační zrychlení a  $\eta$  je viskozita.<sup>1,3</sup>

V situaci, kdy jsou dva různě koncentrované systémy od sebe oddělené polopropustnou membránou, je dovolen průchod pouze molekulám z disperzního prostředí.

Takovému jevu se říká osmóza. Nastává tok rozpouštědla ze systému o menší koncentraci do systému o koncentraci vyšší díky osmotickému tlaku. Závislost osmotického tlaku na koncentraci popisuje van't Hoffova rovnice:

$$\pi = cRT \quad (3)$$

kdy  $c$  udává molární koncentraci látky,  $R$  univerzální plynovou konstantu a  $T$  termodynamickou teplotu.<sup>3</sup>

### 2.2.2 Optické vlastnosti

Optické vlastnosti koloidních soustav jsou závislé na velikosti částic přítomných v soustavě. Dopadem elektromagnetického záření na koloidní soustavu může dojít ke dvěma možným interakcím, a to buď k pravé absorpci nebo k rozptylu záření. Podle charakteru disperzní soustavy pak jedna z interakcí převládá, u analyticky disperzních soustav se jedná o absorpci, zatímco u koloidních a hrubých disperzí převažuje rozptyl.<sup>1,3</sup>

Absorpcí rozumíme pohlcení energetického kvanta záření a následným přechodem molekul na vyšší energetické hladiny při čemž dochází ke zvýšení vnitřní energie molekul, která je přeměněna na teplo. Absorpcí záření se zabýval P. Bouguer, později pak J. H. Lambert a A. Beer, kteří odvodili zákon popisující absorpci záření látkou  $A$  zvaný Lambert-Beerův zákon.<sup>1,4</sup>

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log T = \epsilon cd \quad (4)$$

Přičemž  $I$  je intenzita prošlého záření látkou,  $I_0$  je intenzita dopadajícího záření na látku,  $T$  je transmitance,  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient,  $c$  je koncentrace látky a  $d$  je tloušťka vrstvy, kterou paprsek prochází.

Při rozptylu záření dochází k vyzáření pohlceného energetického kvanta všemi směry beze změny vlnové délky. Jedná se o složitý jev zahrnující odraz, lom, ohyb a interferenci. Pozorujeme ho tehdy, kdy dispergované částice mají odlišnou hodnotu indexu lomu oproti dispergovanému prostředí.<sup>1,5</sup> Prvním pozorovatelem byl fyzik J. Tyndall a po něm pojmenovaný Tyndallův jev. Jedná se o optický efekt, kdy při průchodu úzkého světelného paprsku koloidním systémem, dochází k rozptylu paprsku na koloidních částicích za tvorby světelného kužele.<sup>4</sup>

První klasickou teorii rozptylu formuloval v 19. století J. W. Rayleigh. Při vyzářování pohlcené světelné energie částicí do všech stran beze změn vlnové délky, závisí intenzita

rozptýleného světla na vlnové délce  $I_0$ , elektrických vlastnostech rozptýlené částice (udávaná jako polarizovatelnost  $\alpha$ ), na pozorovací vzdálenosti  $r$  a na permitivitě vakua  $\epsilon_0$ .<sup>1,7</sup>

$$\left(\frac{I}{I_0}\right)_v = \frac{16\pi^4}{r^2\lambda^4} \cdot \left(-\frac{\alpha}{4\pi\epsilon_0}\right)^2 \quad (5)$$

Jedinečnou optickou vlastností koloidních soustav je existence povrchového plasmonu, díky němuž jsou nanočástice kovu intenzivně zbarvené. Po dopadu elektromagnetického záření dochází k oscilaci vodivostních elektronů, které se pohybují se stejnou fází, jako má budoucí vlna. V případě rezonance frekvence elektromagnetického pole s pohybem elektronů dochází k silné absorpci záření.<sup>7</sup>

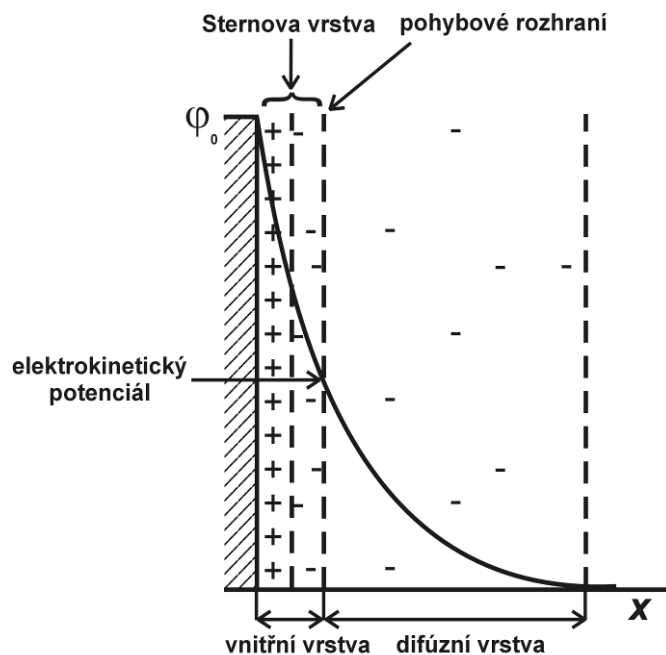
### 2.2.3 Elektrické vlastnosti

Na povrchu koloidních částic je přítomný elektrický náboj, který zásadně ovlivňuje stabilitu koloidu a tím i koagulaci částic. Tento náboj vzniká různými způsoby, např. ustanovováním rovnováhy při přechodu iontu z jedné fáze do druhé, ionizací molekul látky v pevné fázi, adsorpcí jednoho druhu iontu aj. Díky přítomnosti elektrického náboje na povrchu se vytváří okolo částice elektrické pole. Tím pádem dochází k nahromadění částic opačného náboje v blízkosti pole. Tomuto útvaru, skládající se ze dvou opačně nabitých vrstev, se říká elektrická dvojvrstva. Mezi povrchem nabitě částice a částicemi disperzního prostředí dochází k rozdílu elektrických potenciálů. Tento rozdíl se nazývá elektrokinetický potenciál neboli zeta potenciál  $\zeta$ , a je zodpovědný za interakci s vnějším elektrickým polem. Všechny jevy podléhající této interakci, lze nazvat elektrokinetické jevy.<sup>1,10</sup>

Modelem elektrické dvojvrstvy se jako první zabýval H. Helmholtz, který ji popisuje jako deskový kondenzátor. Podle Helmholtzovy teorie je jedna deska kondenzátoru spojena s tuhou látkou na povrchu a druhá, opačně nabitá, je umístěna v blízkosti v kapalině. Zásadním nedostatkem této teorie patří skutečnost, že tloušťka dvojvrstvy je příliš malá a model je nehybný. Další teorií, která byla významným pokrokem je Goüyho-Chapmanova teorie elektrické dvojvrstvy s difuzní vrstvou iontů. Tato teorie odstraňovala nedostatky předchozí, ale vytváří nové. Na ionty tvořící dvojvrstvu bylo pohlíženo pouze jako na bodové náboje. Tento nedostatek odstranil Stern, který zkonstruoval nový model elektrické dvojvrstvy.<sup>4,7</sup>

Sternův model (obr. 1) vymezuje v elektrické dvojvrstvě dvě základní části a bere v úvahu neelektronové interakce mezi ionty a povrchem pevné fáze. První část vrstvy bližší

povrchu pevné fáze je též nazývána Sternova-Helmholtzova vrstva a převládají zde adsorpční síly a ionty jsou přitahovány k povrchu. Druhou částí vrstvy je Goüyho-Chapmanova difúzní vrstva, která je od povrchu dál, ionty jsou zde přitahovány elektrostatickými silami a kde adsorpční síly lze zanedbat. Tyto dvě vrstvy jsou odděleny pohybovým rozhraním. <sup>10,11</sup>



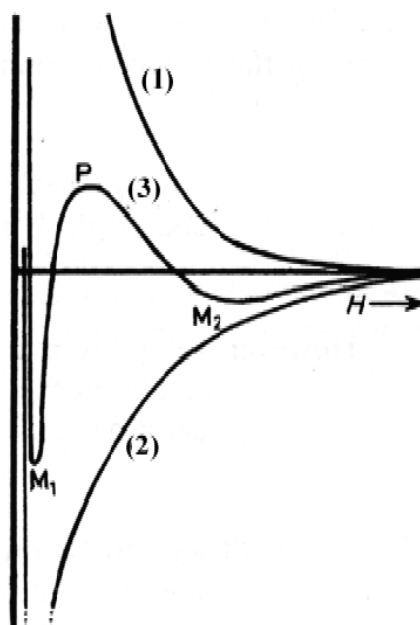
**Obr. 1. Sternův model uspořádání elektrické dvojvrstvy s vyznačeným průběhem zeta potenciálu<sup>1</sup>**

Mezi elektrokinetické jevy lze zařadit elektroforézu, elektroosmózu, potenciál proudění a sedimentační potenciál. Pomocí těchto jevů můžeme určit hodnotu elektrochemického potenciálu. Elektroforéza je jevem, kdy dochází k pohybu částic v stacionárním elektrolytu pomocí elektrického proudu buď k záporné nebo ke kladné elektrodě v závislosti na znaménku náboje částic. V případě, kdy je disperzní prostředí nepohyblivé, např. kapilára, dochází ke vzniku napětí a do pohybu se dá kapalné fáze, roztok elektrolytu. Sedimentační potenciál sledujeme tehdy, kdy dochází k usazování koloidních částic a vzniká rozdíl elektrického napětí mezi elektrodami. V případě použití mechanické síly na roztok elektrolytu v kapiláře dochází k ustavení elektrochemických potenciálů na obou stranách kapiláry. V takovém případě jde o potenciál proudění. <sup>7,11</sup>

## 2.3 Stabilita koloidních částic

Stabilitou se rozumí schopnost překonávat děje, které způsobují změnu v jejich struktuře, rozdělení částic apod. Vzhledem k velkému přebytku povrchové energii, kterou koloidní soustava oplývá, se soustava nachází v tzv. metastabilní formě. Při snaze dostat se do stavu s nižší energií, musí být překonána určitá energetická bariéra, která zabraňuje spojování částic ve větší celky. Energií, která je potřebná pro překonání této bariéry, označujeme jako aktivační energii. Energetická bariéra je u koloidních soustav natolik malá, že stačí i malá energie, která způsobí agregaci částic.<sup>11,12</sup>

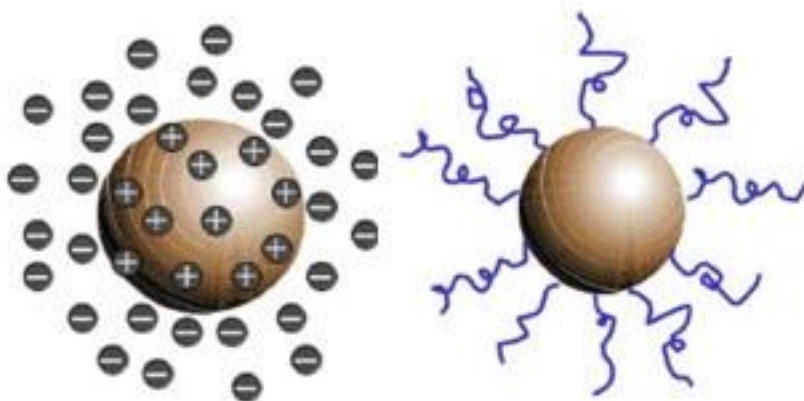
Výsledkem lineární kombinace přitažlivých a odpuzivých sil působících mezi koloidními částicemi v disperzní soustavě je tzv. křivka interakční energie (obr 2.). Hlavními částmi na křivce je primární maximum energie P, primární minimum energie  $M_1$  a sekundární minimum energie  $M_2$ . V prvním minimu energie  $M_1$  jsou koloidní částice spojovány vlivem silných přitažlivých sil, agregují a nelze je převést zpět za vzniku pevných koagulátů. V případě primárního maxima P na přímce, jsou od sebe koloidní částice vzdáleny natolik, že odpuzivé síly převažují nad přitažlivými a celá soustava je stabilní. Tato energie odpovídá hodnotě energetické bariéry. Se zvětšováním vzdálenosti koloidních částic klesá interakční energie, kvůli snižování přitažlivých a odpuzivých sil. V sekundárním minimu energie  $M_2$ , dochází spojováním částic, flokulací, ke vzniku flokulátů. Ty jsou navzájem spojeny slabými interakcemi, a proto je možné oddělit a převést zpět na samostatné částice.<sup>1,11</sup>



Obr. 2. Křivka interakční energie (3) v závislosti na rostoucí vzdálenosti částic  $H$ . (1) - křivka odpuzivých sil, (2) – křivka přitažlivých sil.<sup>1</sup>

Pro udržení stability, je možné lyofobní koloidní systém stabilizovat. Jednou z možností je buď stérická stabilizace anebo elektrostatická stabilizace (obr.3). Principem stérické stabilizace je tvorba adsorpční ochranné vrstvy na koloidní částici pomocí lyofilního koloidu. Tato vrstva je dostatečně silná, která zabraňuje agregaci částic, aniž by ovlivňovala povrchový náboj částice. Stabilizovat je možné pomocí polymerů nebo povrchově aktivních látek. Jako polymer se používá polyakrylamid, polyakrylová kyselina či polystyrén. Výhodami stérické stabilizace je srovnatelná účinnost při vodném či nevodném prostředí a při malém nebo velkém obsahu pevných látek.<sup>11,13</sup>

Elektrostatická stabilizace koloidní soustavy spočívá ve stabilizaci pomocí elektrické dvojvrstvy. Při přibližování koloidních částic stejného náboje dochází ke změně hustoty nábojů iontů na povrchu částic. Díky odpudivým silám mezi částicemi, nedochází k agregaci a systém se stává stabilní. Faktory, které ovlivňují stabilizaci, jsou koncentrace teplota a přídavek elektrolytu. V neposlední řadě i hodnota pH, kdy se snižující hodnotou je sklon k agregaci větší<sup>12,14,15</sup>



**Obr. 3. Typy stabilizace koloidního systému, elektrostatická stabilizace (vlevo) a stérická stabilizace (vpravo)<sup>16</sup>**

Pro popis koloidních soustav stabilizovaných elektrostaticky se používá DLVO teorie. Tato teorie byla vypracována roku 1940 vědci Derjaginem a Landauem a nezávisle na nich pak Verweyem a Overbeekem. Jak už bylo popsáno, koloidní soustava je vlivem odpudivých sil v rovnováze. Tuto rovnováhu můžeme přídavkem elektrolytu zrušit a koloidní soustavu tím destabilizovat. Teorie bere v úvahu jak odpudivé, tak i přitažlivé síly mezi částicemi. Přídavkem elektrolytu dochází ke stlačení elektrické dvojvrstvy a také ke snížení hodnoty

povrchového náboje. Dochází k přibližování částic a následné koagulaci. Elektrická dvojitá vrstva zde tvoří určitou energetickou bariéru, kterou musí elektrolyt překonat, aby došlo ke koagulaci částic. Musí být překročen tzv. koagulační práh  $\gamma$  [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ], který je závislý na koncentraci elektrolytu.<sup>3,17</sup> Tato koncentrace elektrolytu je velmi nízká, což je typické pro koloidní soustavy. Kritická koagulační koncentrace je koncentrace elektrolytu, která je dostatečná pro koagulaci koloidních částic a závisí na náboji proti-iontu.<sup>18</sup>

## 2.4 Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra (AgNP's) patří díky svým unikátním vlastnostem mezi nejdůležitější a nejprozkoumanější systémy oblasti nanotechnologie. Unikátní vlastnosti jako například biologické, optické, katalytické, elektrické a mnohé další jsou spojeny s jejich malým rozměrem  $10^{-6}$  m až  $10^{-9}$  m. Nejčastější uplatnění si našly v dnešní době v katalýze, v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii, a především pro svou antibakteriální aktivitu v biologických aplikacích.<sup>19</sup>

### 2.4.1 Syntéza nanočástic stříbra

Částice koloidních soustav můžeme syntetizovat pomocí dvou známých metod. Méně využívanou metodou je metoda dispergační, kdy pomocí mechanických nebo fyzikálně-chemických procesů dochází ke zmenšování částic. Jedinou prakticky používanou metodou je dispergace v elektrickém oblouku nebo laserová ablace, díky níž lze připravit velmi čisté nanočástice. Výhodou je skutečnost, že pomocí daných metod lze připravit koloidy bez přítomnosti chemických látek.<sup>20,21</sup>

Nanočástice stříbra se tudíž nejčastěji připravují pomocí kondenzačních metod. Nejběžnějším postupem je chemická redukce stříbrné soli, která je rozpustná a vytváří zárodek nové pevné fáze, organickým či anorganickým redukčním činidlem. Tato fáze dále může růst a vznikají tak stabilní částice. Tyto metody jsou rychlé na přípravu, levné, a navíc umožňují ovlivnit konečné vlastnosti částic, jako je tvar a velikost.<sup>22</sup>

Jednou z nejběžnějších příprav nanočástic stříbra je metoda, kterou se zabývali Creighton, Albrecht a Blatchfort. Roztok  $\text{AgNO}_3$  redukovali pomocí silného redukovačného tetrahydridoboritanu sodného ( $\text{NaBH}_4$ ) ve vodném prostředí za vzniku stabilní disperze s malými částicemi (5-20 nm). Tyto částice bohužel nejsou vhodné pro použití v medicíně, kvůli naadsorbování borátového iontu, který způsobuje denaturaci cytochromu P450, na



povrch částice. Dále jsou možné redukce hydrazinem, vodíkem či hydroxylaminem, které jsou ale méně často využívány.<sup>22</sup>

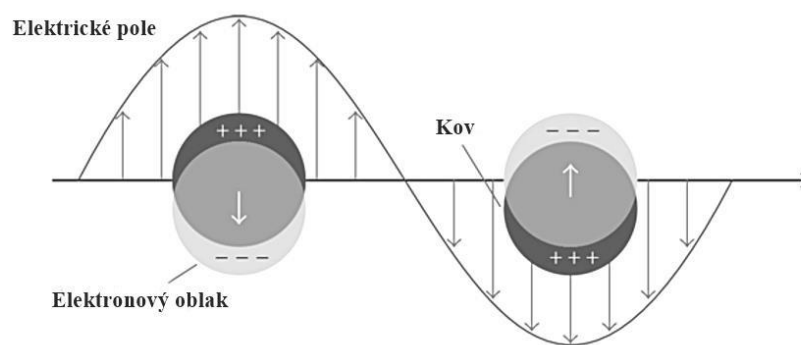
Při organické redukci bývá nejčastěji používán citrát sodný, díky mírnějšímu citrátovému aniontu. Postu přípravy byl navržen chemiky Leeem a Meiselem a bývá často využíván s experimentech povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. Touto metodou lze připravit nanočástice o velikosti 60-80 nm.<sup>23</sup>

Avšak jednou z nejvýznamnějších a nejjednodušších metod pro výrobu nanočástic stříbra je Tollensova syntéza. Proces je založen na nanášení tenkých vrstviček stříbra na povrchy materiálů, kdy velikost nanoseného stříbra je přítomna v řádech mikrometrů. Modifikací Tollensova procesu lze získat podstatně menší částice stříbra. Podstata spočívá ve snížení koncentrace reagujících látek a také přidavku stabilizátorů. Dochází k redukci stříbrných iontů obsažených v komplexu  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  v amoniakálním prostředí pomocí i slabých redukovadel, jako jsou cukry. V závislosti na koncentraci reakčních složek, zvoleném redukovadle a pH lze formovat částice o velikosti v rozmezí 25-400 nm.<sup>22,24</sup>

Alternativními metodami přípravy nanočástic stříbra jsou biosyntetické metody označované jako „green synthesis“, které využívají látky netoxické a šetrné pro životní prostředí. Jako příklad lze uvést redukci  $\text{AgNO}_3$  pomocí houbových a bakteriálních mikroorganismů nebo řas.<sup>25</sup>

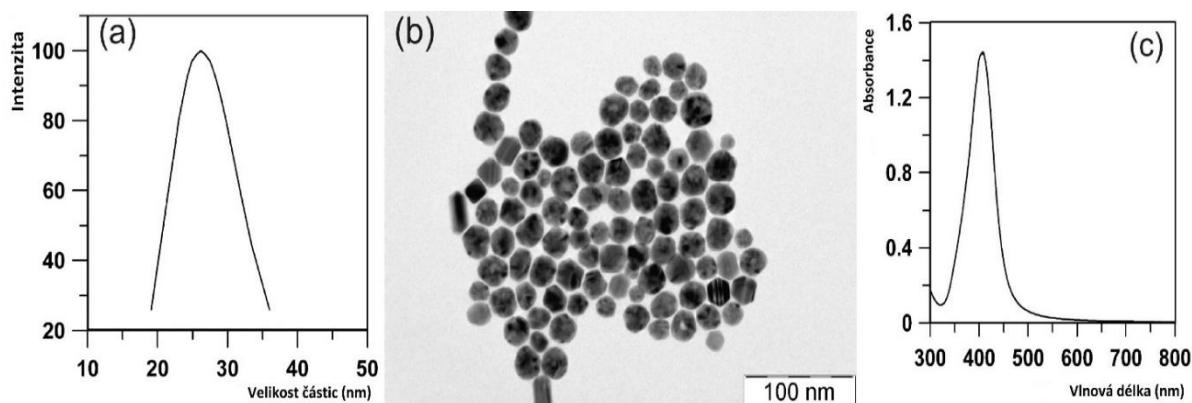
#### **2.4.2 Charakteristika a aplikace nanočástic stříbra**

Nanočástice stříbra jsou při interakci s elektromagnetickým zářením spojeny s povrchovou plasmonovou rezonancí (obr. 4). Při excitaci stříbrné nanočástice v elektromagnetickém poli specifickou vlnovou délkou, oscilují vodivé elektrony na povrchu částice a tím dochází k současné absorpci tohoto záření. Tato oscilace se označuje jako rezonance povrchových plasmonů (SPR – surface plasmon resonance) a díky tomuto jevu jsou soly kovových nanočástic zbarveny. Při změně plasmonu dochází ke změně v absorpčním pásu a naopak. Změny se projeví buď ve změně šířky pásu anebo v jeho posunu k větším nebo menším vlnovým délkám, který se u klasických nanočástic pohybuje v rozmezí 400-530 nm.<sup>8</sup>



**Obr 4.: Povrchová plasmonová rezonance volných elektronů na povrchu nanočástic stříbra<sup>8</sup>**

Nejhlavnějšími technikami, kterými můžeme připravené nanočástice stříbra charakterizovat, jak z hlediska jejich velikosti, tvaru či velikostní distribuce částic, jsou UV-Vis spektroskopie, kdy dochází k pozorování interakcí molekul se zářením za současné absorpce v ultrafialové a viditelné oblasti světla<sup>8</sup>, metoda dynamického rozptylu světla (DLS), která nám poskytuje informace o velikosti částic a jejich zeta potenciálu<sup>27</sup> nebo snímky z transmisního elektronového mikroskopu (TEM), které nám dávají obraz o mikrostruktuře nanočástice řádově od mikrometrů po atomové rozlišení<sup>28</sup> (obr. 5).



**Obr. 5: (a) velikostní rozdělení získané z DLS měření, (b) snímek z TEM mikroskopu, (c) absorpční spektrum nanočástic stříbra o průměru 26 nm<sup>26</sup>**

Co se týče aplikačních možností, nanočástic stříbra si našly své uplatnění v mnoha technologiích, díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem., nejčastěji v elektronice, chemické katalýze, optických a medicínských aplikací. V katalýze se nanočástice stříbra uplatňují coby katalyzátory chemické reakce díky jejich velkému povrchu. V optice jsou nejčastěji používány při detekci nízkých koncentrací v roztoku pomocí metody povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Principem metody je adsorpce molekul analyzované látky na povrch nanočástice stříbra a následné zesílení signálu dochází pomocí dvou mechanismů. K zesílení oproti klasickému signálu může dojít až o  $10^7$  krát.<sup>21,29</sup> V medicíně jsou populární díky svým biologickým vlastnostem jako jsou jejich antibakteriální, antifungicidní a antivirotické vlastnosti. Především jejich antibakteriální vlastnosti se staly fenoménem dnešní doby, díky neustále se zvyšující bakteriální rezistenci.<sup>24</sup>

### **2.4.3 Biologická aktivita nanočástic stříbra**

Téma antibakteriální aktivity nanočástic stříbra se v odborné literatuře začalo objevovat až ke konci 20. stol. Od roku 2006 zájem o toho téma rychle rostl a v letech 2011-2013 dosáhl počtu 1742 vydaných vědeckých publikací na téma antibakteriální aktivita nanočástic stříbra. Tento fakt je důkazem obrovského zájmu o dané téma a jeho nezanedbatelný význam v současné vědě.<sup>30</sup>

Nanočástice jsou považovány za látky s vysokým antibakteriálním účinkem., který závisí na jejich tvaru a velikosti. Bylo prokázáno, že se zmenšující velikostí nanočástic stříbra, roste velikost antibakteriálního efektu. Nanočástice stříbra, připraveny modifikovaným Tollensovým procesem za použití maltosy jako redukční látky, o velikosti 25 nm vykazovaly nízké hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) oproti nanočásticím o velikosti 50 nm. Tyto koncentrace byly v rozmezí 1,69–13,5 mg/l.<sup>24</sup> Při porovnání antibakteriální aktivity nanočástic stříbra o velikosti 8 nm a 28 nm, lepší výsledky vykazovali částice o velikosti 8 nm, díky snadnějšímu průniku mezi póry buněčné membrány a vytváří reaktivních kyslíkových radikálů (ROS).<sup>31</sup> V další studii velikostní závislosti byly testovány nanočástice stříbra v rozmezí velikosti 1-100 nm. Nejúčinnější proti Gram-negativním bakteriím byly částice v rozmezí 1-10 nm.<sup>32</sup> Při studiu antibakteriální aktivity v závislosti na morfologii, byly testovány kulovité, tyčinkovité nanočástice stříbra a ve tvaru trojúhelníkových destiček. Nejlepší výsledky vykazovali trojúhelníkové destičky oproti bakterii *E. coli*.<sup>33</sup>

S použitím nanočástic stříbra jako samostatného antimikrobiálního činidla se dá předpokládat toxický účinek při použití terapeutických dávek v řádech mg/l. Při spojení dvou antimikrobiálních látek, v tomto případě nanočástic stříbra a antibiotik, se dá očekávat synergický účinek. Testování antibakteriální aktivity probíhá nejčastěji pomocí dvou metod, difúzní a diluční. Diluční metoda měří velikost inhibiční zóny antibakteriální látky kolem disku nebo jamky, kdy velikost inhibiční zóny rozhoduje o rezistenci či citlivosti bakterie. Dilučními metodami se určují minimální koncentrace daných látek, tudíž koncentrace látek, při kterých daná bakterie přestává růst. Při studiu kombinace antibiotik a nanočástic stříbra je nejčastěji využívána disková difúzní anebo diluční checkerboard metoda. Pomocí diluční metody je první antibakteriální látka dávkována o různých koncentracích na mikrotitrační destičku ve svislém směru a druhá antibakteriální látka o různých koncentracích ve směru vodorovném. Dostaneme tím šachovnici s kombinacemi různých koncentrací. Hodnocena je minimální inhibiční koncentrace (MIC) obou antibakteriálních látek samostatně i ve vzájemné kombinaci, ze kterých je následně vypočítána frakční inhibiční koncentrace (FIC) dle vzorce:

$$FIC = \frac{MIC \text{ A v kombinaci s B}}{MIC \text{ léčiva A}} + \frac{MIC \text{ B v kombinaci s A}}{MIC \text{ léčiva B}} \quad (6)$$

kde A i B jsou antibakteriální látky. Podle hodnot frakční inhibiční koncentrace dělíme společný účinek antimikrobiálních látek do čtyřech skupin, na účinek synergický ( $FIC \leq 0,5$ ), aditivní ( $0,5 < FIC \leq 1$ ), indiferentní ( $1 < FIC \leq 2$ ) a antagonistický ( $FIC > 2$ ).<sup>34,35</sup>

Synergický účinek kombinace se projevuje jak u Gram-negativních tak i Gram-pozitivních bakterií. Silný a nespecifický synergický účinek byl pozorován u nanočástic stříbra připravené pomocí modifikovaného Tollensova procesu o velikosti 28 nm, stabilizované pomocí želatiny, bez ohledu na chemickou strukturu a mechanismus působení antibiotika.<sup>36</sup> V jiných případech byl společný účinek nanočástic stříbra a antibiotik zesílen tak, až hodnoty MIC klesly na  $10^4$  své původní hodnoty, a dokonce došlo k obnově citlivosti rezistentního kmene k neúčinnému antibiotiku. Příkladem obnovení citlivosti je bakteriální kmen *Escherichia coli*, u kterého byla prokázána rezistence vůči antibiotiku ampicilin i ve vysokých testovaných koncentracích. Při použití kombinace nanočástic stříbra s ampicilinem dochází znovu k obnovení citlivosti na tuto bakterii.<sup>37</sup>

Nanočástice stříbra dále vykazují i antifungální a antivirální aktivitu. Antifungální aktivita nanočástic stříbra byla zkoumána vůči plísni *Candida spp*, která způsobuje kvasinkové infekce. V poslední době dochází ke vzniku rezistence některých hub na

antifungální přípravky, například u rodu *Candida* vzniká rezistence na nejběžnější antimykotikum flukonazol. Při použití nanočástic stříbra o velikosti 25 nm stabilizované dodecylsulfátem sodným (SDS) dochází k inhibici plísně již při koncentraci 0,05 mg/l.<sup>38</sup>

Antivirální aktivita nanočástic stříbra byla jako první potvrzena při testování *in vitro* na viru HIV-1. Zjistilo se, že nanočástice stříbra o velikosti v rozmezí 1-10 nm reagují s virem HIV-1 pomocí zbytků glykoproteinů a inhibují tím vazbu viru na hostitelskou buňku.<sup>39</sup> Dále byla zkoumaná aktivita vůči nejrozšířenějšímu viru hepatitidy B. Nanočástice stříbra o velikosti v rozmezí 10-50 nm s největší pravděpodobností zastavují virovou transkripci RNA přímou vazbou na virus.<sup>40</sup>

#### 2.4.4 Cytotoxicita nanočástic stříbra

V posledních 10 letech je věnována velká pozornost studiu toxicity nanočástic stříbra. Nanočástice stříbra lze z chemického hlediska zařadit mezi kovový materiál a nepředpokládá se, že budou vykazovat stejnou toxicitu tak jako samostatné stříbro nebo jako rozpustné sloučeniny stříbra. Nanostříbro vykazuje specifické účinky především biologické v porovnání s makroskopickými látkami díky své obrovské ploše povrchu. Cytotoxicita nanočástic stříbra byla pozorována u eukaryotických buněk při testování *in vitro* při produkci reaktivních kyslíkových radikálů, poškozování biologických struktur (DNA) nebo při narušování buněčné membrány.<sup>30</sup>

Důležitější testování toxicity nanočástic stříbra probíhá *in vivo*, tudíž experimentálně na laboratorních zvířatech, kterými bývají nejčastěji krysy, myši a potkani. Jednou z důležitých kritérií pro hodnocení toxicity je způsob podání samotných nanočástic stříbra, a to buď perorálně, intravenózně nebo peritoneálně. Při perorálním užití nanočástic stříbra dochází k akutní toxické otravě až v řádově tisícovkách mg/kg hmotnosti potkana. Důležitou roli zde hraje i dávky, kterým byly potkani vystaveny. Ani při koncentraci 2000 mg/l nanočástic stříbra, nebyl pozorován akutní toxický účinek. Vylučování nanočástic stříbra dochází nejčastěji pomocí gastrointestinálního traktu, moči nebo vlasů, v menší míře se ukládají v orgánech jako jsou játra, ledviny a tenké střevo.<sup>41</sup>

### 2.5 Rezistence bakterií vůči antibiotikům

Od objevení penicilinu (20. stol.) a vývojem dalších antibiotik se staly antibiotika jediným léčivem proti infekčním chorobám až do dnešní doby. Tato dlouhá doba užívání, a

především pak nadbytečné a neuvážené podávání především širokospektrálních antibiotik vedlo ke vzniku rezistence na daná antibiotika, přičemž některé se staly až multirezistentními. Typickým příkladem jsou např. methicilin *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin rezistentní *Enterococcus faecium* (VRE) a v neposlední řadě *ESBL Escherichia coli*. Nárůst rezistentních bakterií je jedním z nejdiskutovanějších témat medicíny, a proto dochází k vývoji nových antimikrobiálních látek nebo v lepším případě k obnovení účinku antibiotika.<sup>30,42</sup>

Bakteriální rezistence se dělí podle způsobu vzniku na přirozenou a získanou. Přirozenou neboli primární rezistenci mají ty bakterie, které nemají cílovou strukturu daného antibiotika, příkladem mohou být enterobakterie, které jsou přirozeně rezistentní k penicilinu. Získaná čili sekundární rezistence bakterie vzniká jako následkem evoluce bakteriálního genomu, čímž se dříve citlivá bakterie stává rezistentní na dané antibiotikum. Biochemické mechanismy, které způsobují rezistenci bakterií lze rozdělit do několika skupin: tvorba enzymu, který zabraňuje průniku antibiotiku do buňky, inaktivuje ho nebo ničí, změnou cílové struktury, změna propustnosti cytoplazmatické membrány aj (obr. 6).<sup>43,44</sup>

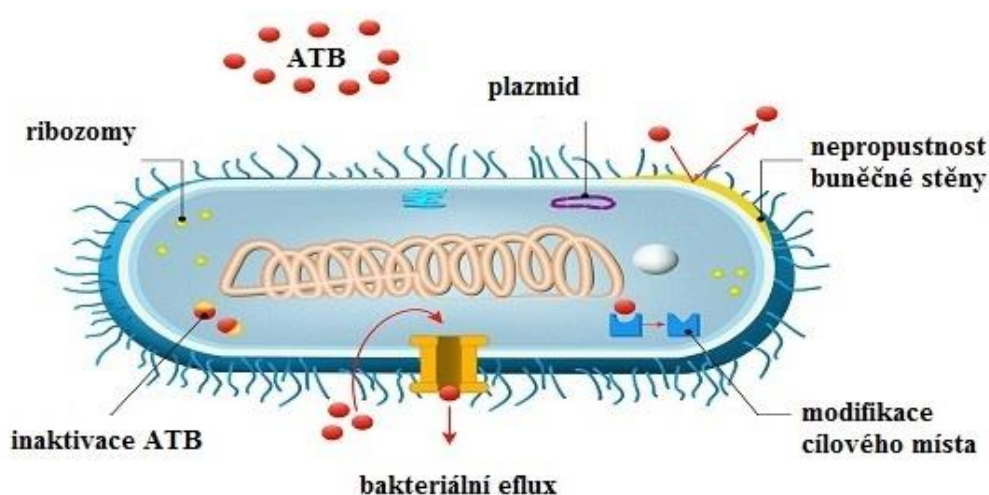
Antibiotika patří mezi přirozené látky, které jsou produkovány mikroorganismy. Lze je třídit podle chemické struktury nebo způsobu účinku na bakterie, který není jednotný u všech antibiotik, díky jejich chemické odlišnosti. Význačnými vlastnostmi antibiotik je specifita, díky níž si antibiotikum vybírá specifická místa v buňce a selektivita, čímž se rozumí účinek antibiotika na určité druhy patogenů bez poškození jedince. Podle mechanismu účinku dělíme antibiotika do čtyřech skupin na antibiotika ovlivňující buněčnou stěnu, proteosyntézu, syntézu nukleonových kyselin nebo cytoplazmatickou membránu.<sup>44,45</sup>

Antibiotika, která ovlivňují buněčnou stěnu, obsahují beta-laktamový kruh. Jedná se o beta-laktamová antibiotika, mezi které patří např. penicilin či ceftazidim. V kontaktu s bakteriální buňkou se váží na proteiny buněčné stěny, díky nimž probíhá syntéza peptidoglykanu, důležitého k tvorbě buněčné stěny. V případě vzniku rezistence bakterie produkují enzym beta-laktamázy, který hydrolyzuje a tím zneškodňuje antibiotikum, mění se vazebné místo nebo dochází ke snížení propustnosti membrány bakterie.<sup>46,47</sup>

Další skupinou antibiotik jsou širokospektrální aminoglykosidová antibiotika inhibující proteosyntézu na ribozomu (translace mRNA do polypeptidového řetězce), na kterých probíhá syntéza bílkovin životně důležitých pro buňku. Příkladem této skupiny antibiotik je tetracyklin či gentamycin. Mechanismus rezistence je nejčastěji způsoben tvorbou modifikovaných enzymů, které pozmění strukturu antibiotika a tím ztrácí svůj účinek. Dalšími možnými mechanismy je modifikace ribozomů a změna vazbového místa<sup>48</sup>

Mezi antibiotika poškozující cytoplazmatickou membránu patří polymyxiny (kolistin), které jsou používány proti Gram-negativním bakteriím. Funkce cytoplazmatické membrány spočívá v selektivním transportu látek do buňky a z buňky ven, tvorbou buněčné stěny a replikací DNA. Mechanismus působení antibiotik spočívá v průchodu buněčné stěny, rozbití cytoplazmatické membrány a následným unikáním cytoplazmy.<sup>49</sup>

Posledním mechanismem účinku jsou antibiotika, které ovlivňují syntézu nukleových kyselin v různých fázích jejich stavby. Příkladem této skupiny jsou chinolony, mezi které patří např. ciprofloxacin. Napadají enzymy, které jsou zodpovědné za replikaci DNA bakterie. Při rezistenci bakterie, dochází k mutaci těchto enzymů a tím se antibiotikum stává neúčinné.<sup>50</sup>



Obr. 6: Schéma s příklady mechanismů rezistence bakteriální buňky na antibiotika<sup>51</sup>

## 2.6 Rezistence bakterií vůči nanočásticím stříbra

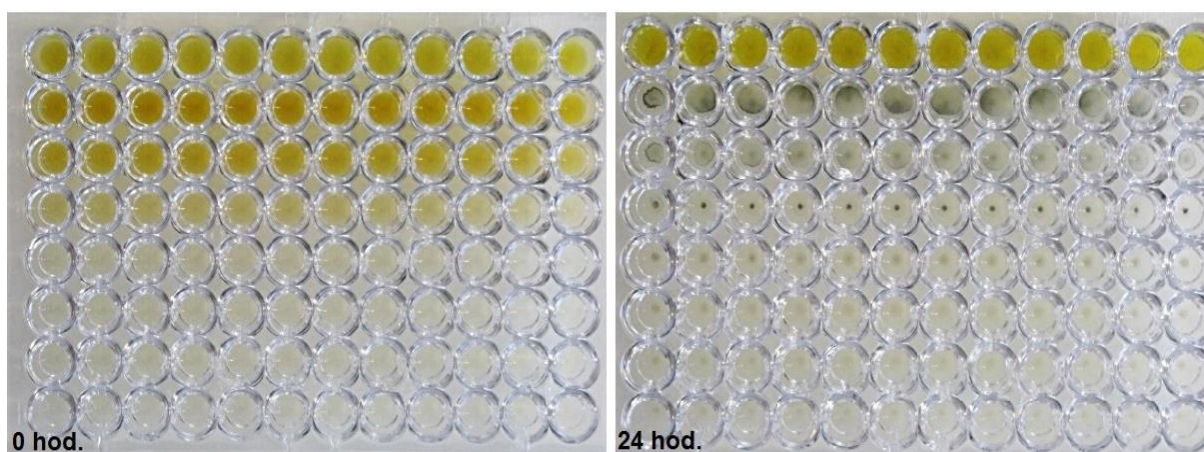
Nanočástice stříbra jsou díky svým antibakteriálním vlastnostem, nízkou toxicitou a schopností pomáhat v boji proti bakteriální rezistenci stále více používané v oblasti medicíny a zdají se být ideálním náhradníkem antibiotik či pouze jejich doplňkem díky synergickému efektu. Avšak otázkou je, zda si bakterie dokáží taktéž vybudovat rezistenci vůči nanočásticím stříbra, stejně jak si vybuďovali k antibiotikům.

Bakteriální rezistence byla testována především u iontového stříbra. Mechanismem dané rezistence bývá nejčastěji bakteriální eflux iontů stříbra z buňky ven nebo snížení

permeability membrány. První případ rezistence bakterie vůči stříbru byl pozorován v roce 1960 na popálenině ošetřené dusičnanem stříbrným. Bakterie, u kterých byla prokázána rezistence na iontové stříbro jsou *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* aj.<sup>52</sup>

V přírodě běžně se vyskytující mikroorganismy vykazují rezistenci na nanočástice a těžké kovy, což je spojeno s častým užíváním antibiotik. Takovým příkladem bakterie může být *P. aureginosa*, která způsobuje infekce v nemocničním zařízení (nozokomiální infekce).<sup>53</sup>

Ve studiu Panáček a kol. z roku 2018 byly testované nanočástice stříbra připravené pomocí modifikovaného Tollensova procesu, jejichž minimální inhibiční koncentrace byla v rozmezí 1,69 – 13,5 mg/l. Pro testování rezistence byly vybrány tyto Gram-negativní bakterie: *Escherichia coli* 013, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Po následné kultivaci bakterie v kultivačním médiu s nanočásticemi stříbra, byla znovu sledována minimální inhibiční koncentrace. První bakterií, která si vytvořila rezistenci byla *Escherichia coli* CCM 3954 u které byla zjištěna zvýšená hodnota MIC 108 mg/l oproti původnímu 3,38 mg/l. Zbylé dvě bakterie si taktéž vybuodovali rezistenci. Hodnoty MIC u *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 byly 54 mg/l oproti 1,69 mg/l a u kmene *Escherichia coli* 013 108 mg/l oproti 13,5 mg/l. Všechny testované bakteriální kmeny si postupem času vytvořili rezistenci vůči nanočásticím stříbra. Tato rezistence se projevovovala agregací nanočástic, změnou zbarvení, a nakonec tvorbou šedočerné sraženiny na dně destičky (obr. 7).<sup>54</sup>



**Obr. 7: Fotografie mikrotitrační destičky znázorňující nanočástice stříbra s rezistentním kmenem *Escherichia coli* CCM 3954 ihned po kultivaci (vlevo) a po 24 hodinách (vpravo)<sup>54</sup>**



## 2.7 Mechanismus účinku nanočástic stříbra

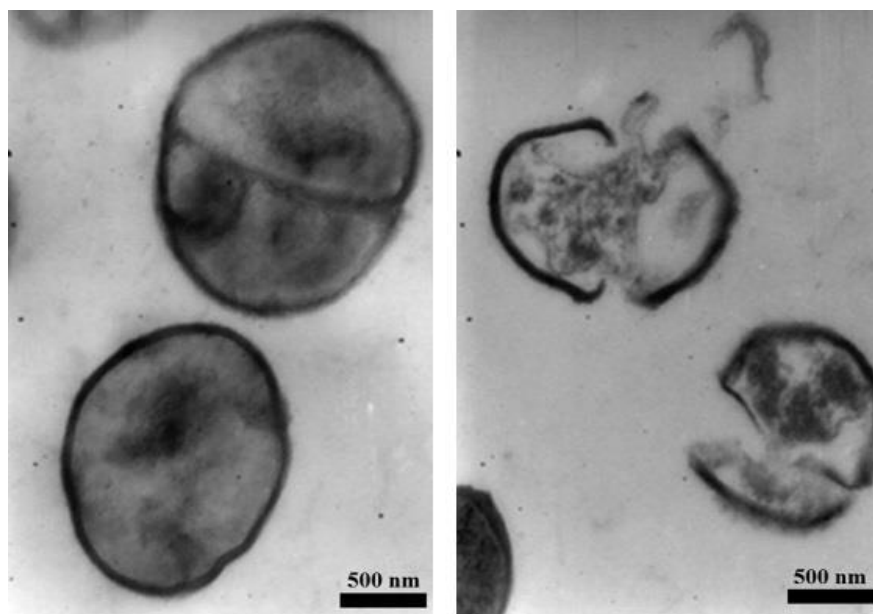
I přes vysoký zájem o nanočástice stříbra v dnešní době, není mechanismus působení nanočástic stříbra na bakterie zcela prozkoumaný. Není přesně známo, jestli nanočástice stříbra působí toxicky na buňky díky vlastní nanočástici nebo vznikajícími stříbrnými ionty. Hlavní výhodou nanočástic stříbra je víceúrovňový účinek na bakterie oproti antibiotikům, které působí specificky.<sup>55</sup>

Studie z roku 2007 uvádí, že stříbrný kationt  $\text{Ag}^+$  je příčinou antibakteriálních vlastností nanočástic stříbra. Podstatou je elektrostatické přitahování kladně nabitého stříbrného iontu se záporně nabitou buněčnou stěnou bakterie.<sup>56</sup> Jiná studie z roku 2004 se zabývá vznikem jam v buněčné stěně v kterých dochází k hromadění nanočástice stříbra snižující její permeabilitu a tím dochází ke smrti bakterie.<sup>57</sup>

Jedním z nejdůležitějších mechanismů působení nanočástic stříbra je jejich interakce s cytoplazmatickou membránou, která je odpovědná za dýchání bakterie a s intracelulárními proteiny s obsahem síry a DNA. Při této interakci dochází ke tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a potlačení účinku proteinů, které hrají důležitou roli v metabolických procesech. Nanočástice stříbra zde blokují přenos elektronů mezi enzymy dýchacího řetězce, tím je zastaven buněčný metabolismus a buňka postupně umírá. Schopnost proniknout do cytoplazmatické membrány je typická pro menší nanočástice s průměrnou velikostí 30 nm a kladným nábojem zeta potenciálu.<sup>24,58</sup>

Porovnáním Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií co se týče větší odolnosti vůči nanočásticím stříbra, jsou odolnější Gram-pozitivní bakterie. Důvodem je stavba i tloušťka buněčné stěny a přítomnost extracelulárních polymerů.<sup>59</sup>

Ve studii Mirzajani a kol. z roku 2011 se zaměřili na tvorbu jamek v buněčné stěně u Gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* PTCC1431. Po kultivaci této bakterie bez nanočástic stříbra, a naopak s nimi, dochází ke tvorbě jamek a kousky buněčné stěny jsou uvolňovány do kultivačního média v podobě peptidoglykanů a muramové kyseliny (obr. 8). Právě přítomnost této kyseliny byla důkazem interakce nanočástic stříbra s buněčnou stěnou bakterie.<sup>60</sup>



Obrázek 8: TEM snímky buněk *Staphylococcus aureus* po kultivaci bez nanočástic stříbra (vlevo) a s nanočásticemi stříbra (vpravo)<sup>60</sup>

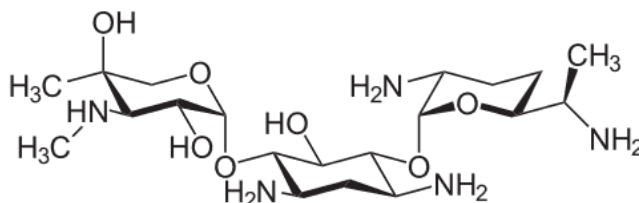
## 2.8 Přehled testovaných antibiotik

### 2.8.1 Gentamicin

Gentamicin (GEN) patří mezi aminoglykosidická antibiotika, jedny z nejstarších a stále hojně užívaných antibiotik. Samotný gentamicin byl izolován v 60. letech minulého století z *Micromonospora purpurea*. Aminoglykosidy mají úzké spektrum účinnosti a vyznačují se rychlým baktericidním účinkem na enterobakterie, stafylokoky a pseudomonády. Při kombinaci s jinými antibiotiky (např. peniciliny nebo glykopeptidy) dochází k rozšíření jejich spektra účinnosti.<sup>61</sup> Chemická struktura aminoglykosidů je složena z jednoho nebo více aminocukrů, které jsou aminoglykosidickými vazbami napojeny na aminocyklitové jádro (obr. 9).

Hlavní mechanismus účinku gentamicinu spočívá v inhibici proteosyntézy. Gentamicin proniká do nitra buňky bakterie a naváže se na 30S podjednotku ribozomu, kde interferuje s vazbou formyl-methionyl-tRNA. Jakmile dojde k napojení gentamicinu na rRNA, nedochází k prodloužení polypeptidického řetězce a tím vznikají nežádoucí bakteriální proteiny. Inhibice působí na začátku proteosyntézy a tímto způsobem je zabráněno vzniku iniciačního komplexu potřebného pro syntézu bílkovin.<sup>61</sup>

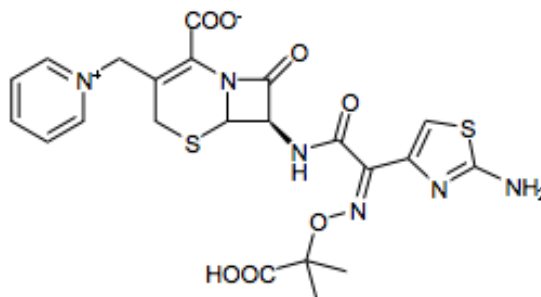
Jedním z nejznámějších mechanismů rezistence u aminoglykosidů spočívá v tvorbě enzymů, které jsou schopny inaktivace antibiotika. Tyto enzymy pozměňují aminové či hydroxylové skupiny aminoglykosidu. Výsledkem je zablokování interakce antibiotika s cílovou molekulou bakteriálního ribozomu. Další mechanismus rezistence spočívá v propustnosti vnější membrány. Antibiotikum je účinné v případě, kdy se do nitra buňky dostane v takové koncentraci, aby bylo schopno utlumit funkce cílových molekul. Ve vnější membráně gramnegativních bakterií jsou přítomny proteinové kanálky (poriny), jimiž prochází částice dovnitř buňky. Mutacemi těchto kanálků, však dochází ke změně transportu a tím i zabránění průniku antibiotika do buňky. Další možnost rezistence spočívá v mutaci ribozomové bílkoviny, která má za následek snížení vazby antibiotika na 30S podjednotku ribozomu.<sup>62</sup>



Obrázek 9: Chemická struktura gentamicinu<sup>62</sup>

## 2.8.2 Ceftazidim

Ceftazidim (CTZ) zástupce cefalosporinů řadíme mezi beta-laktamová antibiotika, pro které je charakteristický betalaktamový kruh, který se skládá ze tří atomů uhlíku a jednoho atomu dusíku. V případě cefalosporinů je k betalaktamovému kruhu připojen šestičlenný dihydrothiazinový cyklus s obsahem síry (obr. 10).



Obrázek 10: Chemická struktura ceftazidimu<sup>63</sup>

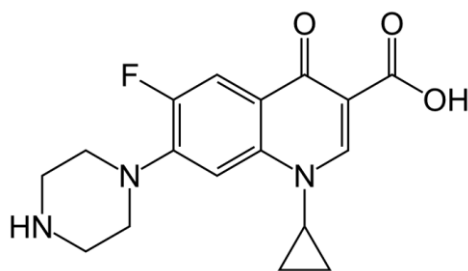
Mechanismus působení spočívá ve vazbě na enzymy, které jsou potřebné ke tvorbě peptidoglykanu, jednou ze základních složek v buněčné stěně. Dochází k tvorbě glycinových a peptidových můstků spojujících N-acetylglukosaamin a kyselinu N-acetylmuramovou taktéž zvané PBP (proteiny vázající penicilin). Při vazbě ceftazidimu na PBP se zastaví tvorba peptidoglykanové vrstvy, uvolňují se autolytické enzymy, které způsobují rozvolnění buněčné stěny. Výsledkem je buněčná smrt.<sup>64</sup>

Nejčastějším mechanismem rezistence, který vede k inhibici účinku beta-laktamových antibiotik spočívá v produkci enzymů zvané beta-laktamázy, které hydrolyzují beta-laktamový kruh antibiotik. První beta-laktamáza TEM-1 byla izolována v 60. letech minulého století z *E. Coli*. V současné době je známo více než 340 různých typů těchto enzymů produkovaných jak gramnegativními, tak i grampozitivními bakteriemi. Geny schopné kódovat beta-laktamázy se nachází na chromozomu bakterie. Enzymy mohou být produkovány dvěma různými způsoby, a to buď nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti antibiotika, anebo v případě, že se v blízkosti buňky nachází beta-laktamové antibiotikum. K překonání aktivity enzymů (TEM-1 a SHV-1) bylo vyvinuto spousta beta-laktamových antibiotik, jedním z nich byl i ceftazidim, který byl v průběhu 80. let hojně užíván. Velmi rychle se zde taktéž objevila rezistence na tzv. širokospektré beta-laktamázy (ESBL), které jsou schopné hydrolyzovat i tato antibiotika.<sup>65</sup>

### 2.8.3 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin (CIP) řadíme mezi chinolonová antibiotika, respektive fluorochinolonová antibiotika (obr. 11), která se vyznačují zajímavým mechanismem působení na molekulu DNA a širokým spektrem účinnosti. Fluorochinolony inhibují bakteriální enzymy potřebné pro syntézu DNA (topoizomeráza, DNA-gyráza) a zamezují tím další replikaci bakteriální DNA. Antibiotikum interaguje s komplexem vytvořeným mezi jedním z enzymů a molekulou DNA. Tato interakce vede ke změnám v konformaci a inhibici normální aktivity enzymů.<sup>66</sup>

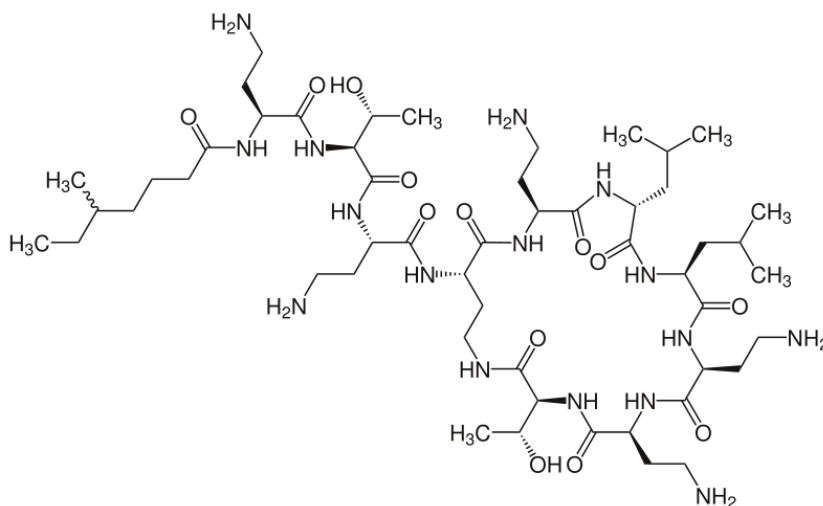
Rezistence na fluorochinolony je způsobena chromozomálními mutacemi u obou enzymů. Mutaci v genu *gyrA*, který je kódován DNA gyrázou, dochází ke snížení afinity antibiotika na pozměněný komplex gyráza-DNA. Mutace topoizomerázy IV probíhá nejčastěji u grampozitivních bakterií.<sup>66</sup>



**Obrázek 11: Chemická struktura ciprofloxacinu<sup>66</sup>**

### 2.8.4 Kolistin

Kolistin (taktéž nazývaný polymyxin E, COL) patří mezi cyklická polypeptidová antibiotika, která řadíme do skupiny polymyxinů. Známé jsou též polymyxiny A, B, C, D. Strukturně jsou polymyxiny podobné kationickým antimikrobiálním peptidům, které se skládají z cyklického peptidu s postranními řetězci na N-konci acylovanou skupinou mastných kyselin (obr. 12). Kolistin je vícesložkové antibiotikum, skládající se z chemicky podobných molekul - kolistinu A a B, které se liší v acylové skupině na N-konci.<sup>67</sup>



**Obrázek 12: Chemická struktura polymyxinu E<sup>67</sup>**

Spektrum účinnosti kolistinu je docela úzké, vyznačuje se především v baktericidní účinnosti proti gramnegativním aerobním tyčkám (např. *E. Coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.). Neúčinné je oproti všem gramnegativním kokům, grampozitivním bakteriím a anaerobním bakteriím.<sup>67</sup>

Mechanismus působení kolistinu není doposud zcela objasněný. Nejpravděpodobnějším mechanismem účinku je buněčná stěna bakterie, kde mezi kladně nabitými molekulami kolistinu a záporně nabitého lipidu A v bakteriální membráně dochází vlivem elektrostatické interakce k vytlačení kationtů z lipidu. Dochází tím k destabilizaci lipopolysacharidu (LPS), zvýšení propustnosti bakteriální membrány, kterou uniká intracelulární obsah z buňky ven a nastává tím smrt bakterie.<sup>68</sup> Alternativním mechanismem je schopnost kolistinu zprostředkovat kontakt mezi vnitřní a vnější vrstvou periplazmatické membrány. Vnější membránu překovává vlivem působení elektrostatických sil a následně dochází k výměně fosfolipidů mezi vnitřní a vnější membránou. Tím dochází ke strukturálním změnám a posléze k lýze buňky. Dalšími možnostmi mechanismu je schopnost kolistinu vyvolat lýzu buňky. Dochází ke tvorbě volných kyslíkových radikálů (ROS), které způsobují oxidativní stres bakterie a tím jsou poškozeny lipidy, DNA a proteiny.<sup>69</sup>

Mechanismus rezistence se dělí na rezistenci přirozenou či rezistenci získanou. U většiny rezistentních bakterií mechanismus rezistence spočívá v modifikaci lipidu A lipopolysacharidu (LPS) ve vnější membráně gramnegativních bakterií. Další časté mechanismy mohou být efluxní pumpy, poriny nebo v nedávné době nově popsany mechanismus zprostředkovaný plazmidy. Tento způsob rezistence byl objeven nedávno roku 2015 v Číně a vyvolává znepokojení, co se týče užití kolistinu, jako poslední volby. Mechanismus rezistence spočívá ve změně cílového místa. Dochází k modifikaci lipidu A v buněčné membráně navázáním fosfoethanolaminu či 4-amino-4-deoxy-L-arabiny a tím ke zvýšení kladného náboje lipopolysacharidu (LPS), který je počátečním místem účinku kolistinu. Kladně nabitě molekuly kolistinu pak kvůli výrazně nižší afinitě nejsou schopny interagovat s LPS. Dochází ke snížení elektrostatické interakce mezi bakterií a kolistinem.<sup>67</sup>

## 3. Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

Pro přípravu nanočástic stříbra byly použité následující chemikálie: dusičnan stříbrný (Sigma Aldrich), hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner s.r.o.), amoniak (p.a., vodný roztok, 28-30 % (v/v), (Sigma Aldrich.), D (+) - maltóza monohydrát (Sigma-Aldrich), tetrahydridoboritan sodný (Sigma Aldrich.), citronan sodný (Lach-Ner s.r.o ), destilovaná voda.

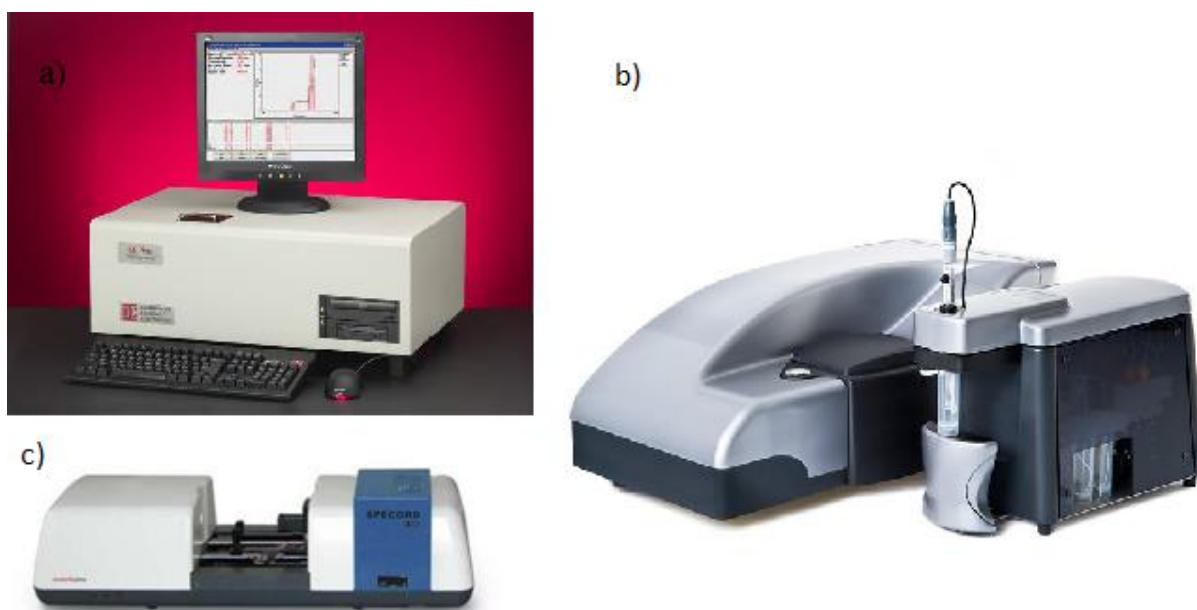
Pro testování stability koloidu nanočástic stříbra, redukováný pomocí maltosy byl použit glukosamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich) a O – fosforylethanolamin (Sigma-Aldrich).

Pro testování antibakteriální aktivity byla použita antibiotika rozpuštěná ve vodě o koncentraci 10000 mg/l dodaná mikrobiologickým ústavem Lékařské fakulty UP v Olomouci – kolistin, ceftazidim a gentamicin. Výjimkou bylo antibiotikum ciprofloxacín, které bylo dodáno o koncentraci 1000 mg/l. Na testy antibakteriální aktivity byl použit Mueller-Hintonův bujon na jehož přípravu o objemu 1 litr je potřeba 5 g hovězí extraktu (Difco), 17,5 g kaseinového hydrolyzátu (HIMEDIA) a destilované vody. Následně je směs upravena pomocí NaHCO<sub>3</sub> na hodnotu pH 7,2 a sterilizována v autoklávu po dobu 20 min při teplotě 121 °C.

Na testy antibakteriální aktivity byly vybrány bakteriální kmeny ze sbírky Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, jmenovitě *Escherichia Coli* CE 5556 ESBL, *Enterobacter Koebe* 3683/C/2018 a *Pseudomonas Aeruginosa* 21425/CCC/2017.

### 3.2 Experimentální vybavení

Na experimentální pokusy bylo použité následující vybavení: digitální analytické váhy (AND HM-120), pH meter (Eutech Instruments pH 700), elektromagnetická míchačka (HEIDOLPH MR), laboratorní sušička (iBiotech), přístroj Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (Brookhaven Instrumentals Corporation, USA) pro měření velikosti nanočástic, Specord S 600 (Analytik Jena AG, Německo) na měření UV/Vis absorpčních spekter, přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) pro měření zeta potenciálů, transmisní elektronový mikroskop (JEM 2010-Joel) a mikrobiologický inkubátor (Heratherm).



Obr. 13: Přístroj Zeta Potential Analyzer Zeta Plus pro měření velikosti částic (a)<sup>70</sup>, přístroj Zetasizer pro měření zeta potenciálu (b)<sup>71</sup> a spektrofotometr Specord S 600 (c)<sup>72</sup>

### 3.3 Syntéza nanočástic stříbra

Nanočástice stříbra (AgNP's) byly připraveny pomocí modifikovaného Tollensova procesu o koncentraci stříbra v disperzi 108 mg/l. Principem metody je redukce diaminstříbrného komplexu  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  v alkalickém prostředí zvolenou redukční látkou.



Do 50 ml kádinky umístěné na elektromagnetické míchačce byly za laboratorní teploty ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) a stálého míchání smíchány následující látky: 5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l s 1,25 ml roztoku  $\text{NH}_3$  o koncentraci  $10^{-2}$  mol/l. Vzniklý diaminstříbrný komplex je zředěn 12,75 ml destilované vody, aby celkový objem směsi dával 25 ml. Pro zalkalizování směsi je přidán 1 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,24 mol/l a poté je diaminstříbrný komplex redukován přidavkem 5 ml roztoku D-maltosy o koncentraci  $5 \cdot 10^{-2}$  mol/l.



Druhou metodou přípravy nanočástic stříbra je příprava pomocí redukčního činidla tetrahydridoboritanu sodného  $\text{NaBH}_4$ . První kroky přípravy jsou shodné s předchozím postupem. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače smícháme 5 ml roztoku dusičnanu stříbrného ( $\text{AgNO}_3$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l a 1,25 ml roztoku  $\text{NH}_3$  o koncentraci  $10^{-2}$  mol/l. Dále bylo přidáno 13,75 ml destilované vody a 2,5 ml roztoku dihydrátu citrátu trisodného ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l jako stabilizátoru. Na redukci komplexu bylo použito 2,5 ml tetrahydridoboritanu sodného ( $\text{NaBH}_4$ ) o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l.

Výroba nanokompozitu kyanografenu s přidavkem nanočástic stříbra (G\_CN/AgNP's) spočívala v přidavku 2 ml roztoku  $\text{AgNO}_3$  ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) k 5 mg derivátu grafenu o koncentraci 750 mg/l. Směs byla sonifikována 10 min a následně 20 min míchána na elektromagnetické míchače. Do směsi bylo přidáno 2 ml roztoku amoniaku ( $3,2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) a před přidáním 4 ml  $\text{NaBH}_4$  ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) jako redukčního činidla, bylo přidáno 2 ml citrátu sodného ( $6,9 \cdot 10^{-3}$  mol/l) za účelem stabilizace roztoku. Koncentrace stříbrných iontů v takto připraveném kyanografenu je 183 mg/l.<sup>66</sup>

Roztok dusičnanu stříbrného byl připraven o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l a po dobu testování byl uchováván v temnu, aby bylo zabráněno v redukci stříbrných iontů působením světla.

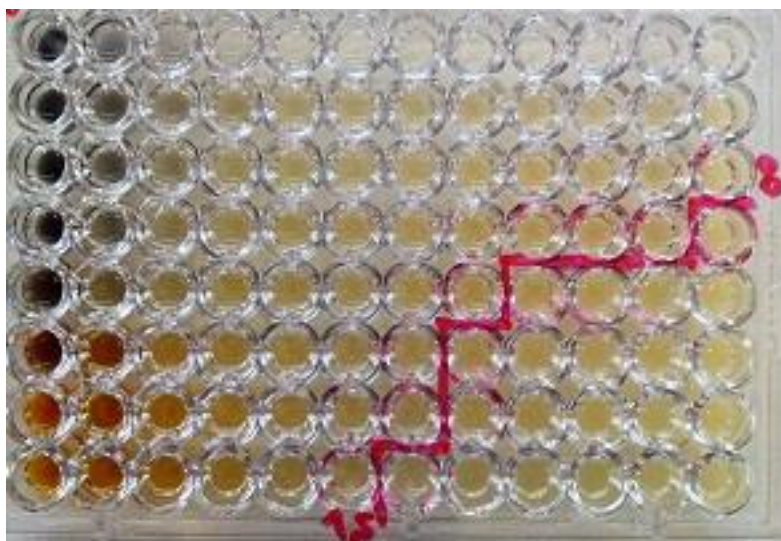
### 3.4 Stanovení antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita byla testována pomocí standardní mikrodiluční metody, stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) látky, která je potřebná k inhibici růstu bakterie. Testování probíhalo na mikrotitračních destičkách, kde dochází k rozředování látky geometrickou řadou v Müeller-Hintonově bujONU přidavkem 100  $\mu\text{m}$  bujONU na koncentrace v rozmezí 54-0,084 mg/l. Po rozředění disperze je do jamek očkována příslušná bakterie, jejíž hustota odpovídala  $10^{5-6}$  CFU/ml (colony forming units – jednotka tvorby kolonie). Následně jsou mikrotitrační destičky inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Na závěr je odečtem stanovená hodnota minimální inhibiční koncentrace.

Při testování společného antibakteriálního účinku byla použita tzv. checkerboard metoda, kdy se na rozředěnou antibakteriální látku na mikrotitrační destičce dává druhá antibakteriální látka, také rozředěná geometrickou řadou, v kolmém směru. Vzniká tak šachovnice s různými kombinacemi koncentrací obou testovaných látek (obr. 14). Do jamek

je poté naočkováána příslušná bakterie a po 24 hodinové inkubaci při 37 °C je vyhodnocován růst či inhibice bakterie v jamkách. Na základě získaných minimálních inhibičních koncentrací příslušných jamek je vypočtena frakční inhibiční koncentrace (FIC) pomocí níž je rozdělen společný efekt působení na čtyři skupiny ( FIC ≤ 0,5 byla hodnocena jako synergie SYN, 0,5 < FIC ≤ 1 jako částečná synergie PSYN, 1 < FIC ≤ 2 byl hodnocený jako indiferentní IND a FIC > 2 jako antagonistický ANT účinek).

$$FIC = \frac{MIC\ A\ v\ kombinaci\ s\ B}{MIC\ léčiva\ A} + \frac{MIC\ B\ v\ kombinaci\ s\ A}{MIC\ léčiva\ B}$$



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	GEN
A													32
B													16
C													8
D									0,61333	0,55333	0,52667		4
E								0,48333					2
F							0,59167						1
G							0,52917						0,5
H													0
Ag	54	27	13	6	3	1,5	0,7	0,35	0,17	0,08	0,04	0	

**Obr. 14:** Snímek mikrotitrační destičky s vyznačenými minimálními inhibičními koncentracemi (MIC) testovaných látek a rozhraním růstu bakterie (nahore) a „přepis“ mikrotitrační destičky do tabulky s vyznačenými koncentracemi testovaných látek a vypočtenými frakčními inhibičními koncentracemi (FIC) (dole)

V testech antibakteriální aktivity byly použity multirezistentní kmeny *Escherichia coli* CE5556 produkující beta – laktamázu, rezistentní taktéž k aminoglykosidům a chinolonům, *Enterobacter kobei* 3683/C/2018 kolistin rezistentní a panrezistentní kmen *Pseudomonas aeruginosa* R 21425/CCC/2017. Na obnovení účinnosti byla vybrána tato antibiotika – gentamicin, ceftazidim a ciprofloxacin pro testování kmenu *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a kolistin pro *Enterobacter kobei*. Na testování synergického účinku byly použity nanočástice stříbra redukované pomocí maltosy, nanočástice stříbra redukované tetrahydridoboritanem sodným, dusičnan stříbrný a nanokompozit kyanografenu s obsahem nanočástic stříbra.

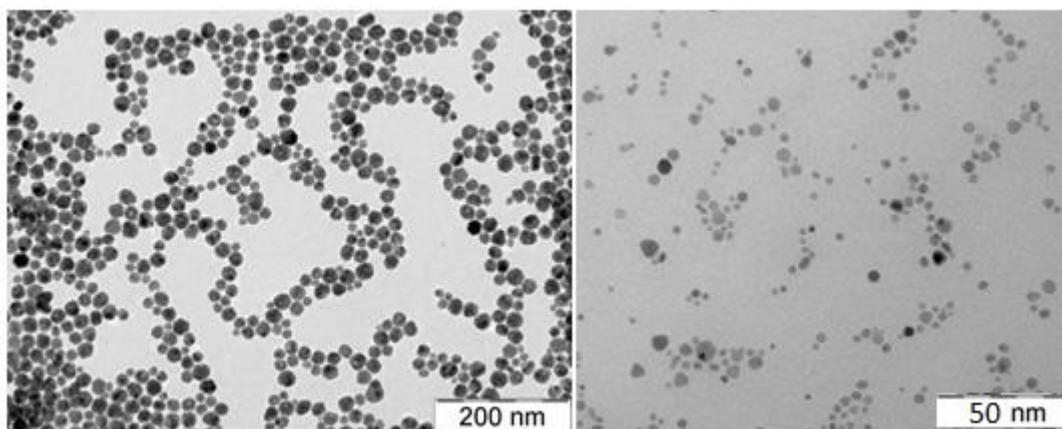
### **3.5 Příprava vzorků pro testování stability koloidu nanočástic stříbra**

Při testování stability koloidu nanočástic stříbra byly použity nanočástice stříbra připravené pomocí modifikovaného Tollensova procesu redukované pomocí maltosy. Do roztoku nanočástic stříbra o koncentraci 6 mg/l doplněné na objem 10 ml vodou anebo MH bujonem umístěné na elektromagnetické míchačce, byla za stálého míchaní určována koagulační koncentrace zvláště kolistinu, fosfoethanolaminu a glukosaminu. Následně byla určována koagulační koncentrace fosfoethanolaminu a glukosaminu po přidání do směsi nanočástic stříbra s kolistinem. Po každém přidavku bylo proměřeno pH roztoku, spektrum a zeta potenciál.

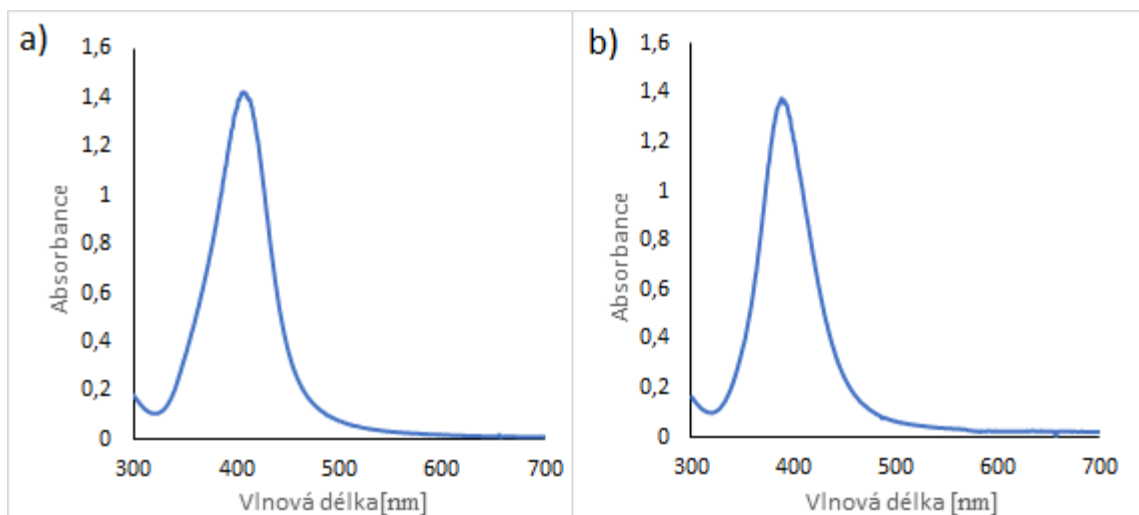
## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Charakterizace nanočástic stříbra a nanokompozitu G\_CN/AgNP's

Koloidní disperze nanočástic stříbra byla připravena jak klasickou Tollensovou metodou pomocí redukční látky maltosy a druhým způsobem, kde jako redukční látka byl použit tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ) stabilizovaný citrátem sodným. Ihned po přípravě disperzí byla proměřena velikost částic a absorpční spektrum. Průměrná velikost nanočástic připravených redukcí pomocí maltosy byla 28 nm a pomocí  $\text{NaBH}_4$  8 nm. Velikost nanočástic byla ověřena i pomocí transmisní elektronové mikroskopie (obr. 15). Obě připravené disperze vykazovaly podobnou hodnotu  $\text{pH}=9$ . Na absorpčních spektrech nanočástic stříbra redukované pomocí maltosy je zachycen charakteristický pík při 410 nm vlnové délky. U disperze redukované  $\text{NaBH}_4$  byl pozorovaný absorpční pík posunutý ke kratším vlnovým délkám okolo hodnoty 390 nm, což značí přítomnost menších částic (obr. 16). Tato skutečnost byla ověřena i pomocí snímků z transmisního elektronového mikroskopu.



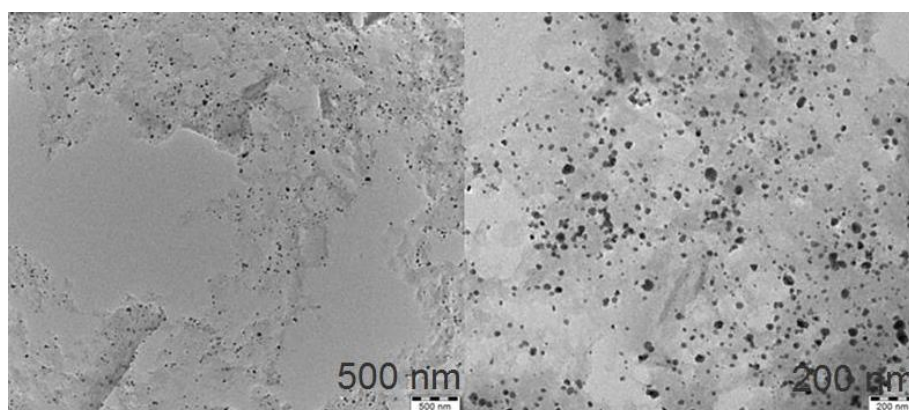
**Obr. 15: TEM snímek nanočástic stříbra z disperze redukované maltosou o koncentraci 108 mg/l (vlevo) a redukované pomocí  $\text{NaBH}_4$  o koncentraci 108 mg/l (vpravo)**



**Obr. 16: UV-Vis spektrum připravených nanočástic stříbra o koncentraci 108 mg/l (a) redukováno pomocí maltosy a (b) redukováno pomocí tetrahydridoboritanu sodného**

Použití redukčních činidel s různou redukční silou při přípravě nanočástic stříbra hraje důležitou roli ve výsledné velikosti nanočástic stříbra. Při použití slabší redukční látky maltosy dochází k pomalému vzniku zárodků nanočástic stříbra, které pak v následující fázi redukčního procesu rostou v částice větší velikosti. Naproti tomu při použití silnějšího redukčního činidla tetrahydridoboritanu sodného dochází v nukleační fázi redukce k rychlému vzniku velkého počtu zárodků, které pak v následné fázi redukce rostou méně vzhledem k tomu, že velká část stříbrných iontů byla spotřebována při tvorbě zárodků nové fáze.

Suspenze nanokompozitu kyanografenu s obsahem nanočástic stříbra byla připravena pomocí redukčního činidla  $\text{NaBH}_4$  za použití stabilizátoru citrátu sodného odbornými pracovníky v RCPTM. Pro charakterizaci roztoku byla použita transmisní elektronová mikroskopie (obr. 17). Dále bylo proměřeno pH roztoku 9,04, zeta potenciál -34,6 V a velikost nanočástic kompozitu 179,7 nm.



**Obr. 17: TEM snímek kompozitu kyanografenu s obsahem nanočástic stříbra.**

## 4.2 Obnovení účinku antibiotik vůči kmeni *Escherichia coli* ESBL

Při testování společného působení antibiotik a nanočástic stříbra vůči bakteriálnímu kmeni *Escherichia coli* CE ESBL 5556 byla použita následující antibiotika – gentamicin, ceftazidim a ciprofloxacin. Antibiotika byla vybrána dle mechanismu působení na bakterii.

*Escherichia* patří mezi gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie. Jde o tyčinkovitou bakterii, pohybující se pomocí bičků. Vnější membrána je pokryta lipopolysacharidem (LPS) a v lipidové dvojvrstvě jsou obsaženy membránové proteiny (poriny). Žije v trávicím traktu teplotokrevných živočichů a patří mezi jedny z nejdůležitějších zástupců střevní mikroflóry. *Escherichia coli* je citlivá na většinu antibiotik.<sup>65</sup>

Gentamicin (GEN) patří mezi aminoglykosidická antibiotika, která inhibují syntézu bílkovin (proteosyntéza). Gentamicin proniká do nitra buňky a naváže se na 30S podjednotku ribozomu. Zde dochází k interferenci s vazbou formyl-methionyl-tRNA. Inhibice působí na začátku syntézy, kdy je tímto způsobem zabráněno vzniku iniciačního komplexu potřebného pro syntézu bílkovin. U *E. coli* zde byla potvrzena bakteriální rezistence vůči testovanému antibiotiku (MIC GEN 64 mg/l). Mechanismus rezistence zde spočívá ve změně permeability membrány či effluxu. Vznik rezistence tímto mechanismem znesnadňuje či přímo zabraňuje průniku antibiotika do nitra bakteriální buňky. Dochází k pozměnění struktur na povrchu buňky, jako jsou například poriny, kanálky, které umožňují prostupnost antibiotik do nitra buňky.

Ceftazidim (CTZ) coby beta-laktamové antibiotikum inhibuje tvorbu buněčné stěny a tím dochází k jejímu oslabení a snadnému průniku antibiotika dovnitř buňky. Ceftazidim se k buněčné stěně připojí pomocí beta-laktamového kruhu, který se váže na specifické struktury na povrchu buňky. Dále dochází k inhibici tvorby peptidoglykanu vazbou na transpeptidázy a karboxypeptidázy a blokáci syntézy buněčné stěny. Rezistence bakterie na tato antibiotika spočívá v tvorbě enzymu beta – laktamázy, který způsobuje hydrolýzu daného antibiotika (MIC CTZ 16 mg/l). *Escherichia coli* ESBL produkuje širokospektré beta-laktamázy (ESBL- z angl. extended spectrum beta-lactamases). ESBL vznikly změnami v pořadí aminokyselin a dalšími mutacemi a hydrolyzují antibiotika se širokým spektrem účinnosti, např. ceftazidim.

Ciprofloxacin (CIP) zastupuje fluorchinolony, které zamezují replikaci DNA tím, že inhibují enzymy, které jsou v tomto procesu potřebné. Zejména se jedná o enzymy DNA-gyráza a topoizomeráza IV, které jsou zodpovědné za správné splétání a rozplétání řetězce

DNA v průběhu buněčného cyklu. *E. coli* je vysoce rezistentní k ciprofloxacinu a mechanismus rezistence spočívá v mutaci enzymu gyrázy (MIC CIP 32 mg/l). Rezistence může vznikat díky chromosomálním mutacím na obou enzymech. Při mutaci genu *gyrA*, který je kódován DNA gyrázou, dochází ke snížení afinity ciprofloxacinu ke změněnému enzymatickému komplexu. Tato rezistence se častěji vyskytuje u gramnegativních bakterií, zatímco u grampozitivních bakterií jsou mutace častější pro enzym topoisomerase IV.

Podle mechanismu účinku vybraných antibiotik lze synergický účinek očekávat v kombinaci s nanočásticemi stříbra, dusičnanem stříbrným a kyanografenem u gentamicinu, pokud rezistence spočívá ve změně permeability membrány a ceftazidimu. U ciprofloxacinu synergický účinek očekávaný není, jelikož jak účinek antibiotika, tak mechanismus rezistence se odehrává v nitru buňky.

**Tabulka 1: *Escherichia coli* CE ESBL 5556 – MIC testovaných vzorků a společný účinek kombinace testovaná látka – ATB (MIC GEN 64 mg/l , CTZ 16 mg/l a CIP 32 mg/l)**

	MIC [mg/l]	FIC (GEN)	Účinek	FIC (CTZ)	Účinek	FIC (CIP)	Účinek
AgNP's red. maltosou	13,500	0,473	SYN	0,636	PSYN	1,143	IND
AgNP's red. NaBH <sub>4</sub>	3,375	0,492	SYN	0,679	PSYN	1,285	IND
AgNO <sub>3</sub>	3,375	0,498	SYN	0,748	PSYN	1,313	IND
GCN/AgNP's	11,430	0,494	SYN	0,811	PSYN	1,500	IND

Výsledky antibakteriální aktivity kombinace vybraných antibiotik a nanočástic stříbra, AgNO<sub>3</sub> a kyanografenu uvedené výše v tabulce 1 prokázaly závislost na mechanismu účinku antibiotika a mechanismu rezistence bakterie na antibiotika.

Při testování gentamicinu, aminoglykosidického antibiotika, vůči rezistentnímu kmeni *Escherichia coli* CE ESBL 5556 s minimální inhibiční koncentrací 64 mg/l, byla pozorována synergie ve všech testovaných případech. Gentamicin inhibuje syntézu proteinů v nitru buňky bakterie, tím, že se naváže na 30S podjednotku ribozomu. Ke společnému působení gentamicinu a nanočástic stříbra by podle odlišného mechanismu účinku na bakterie docházet nemělo. Jedním z nejdůležitějších mechanismů působení stříbra je jejich interakce s cytoplazmatickou membránou, která je odpovědná za dýchání bakterie. Při této interakci dochází ke tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a potlačení účinku proteinů, které hrají důležitou roli v metabolických procesech. Dochází k blokování přenosu elektronů mezi enzymy důležité pro dýchací řetězec, tím je zastaven buněčný metabolismus a buňka postupně umírá. Mechanismus rezistence zde tudíž musí spočívat ve změně permeability

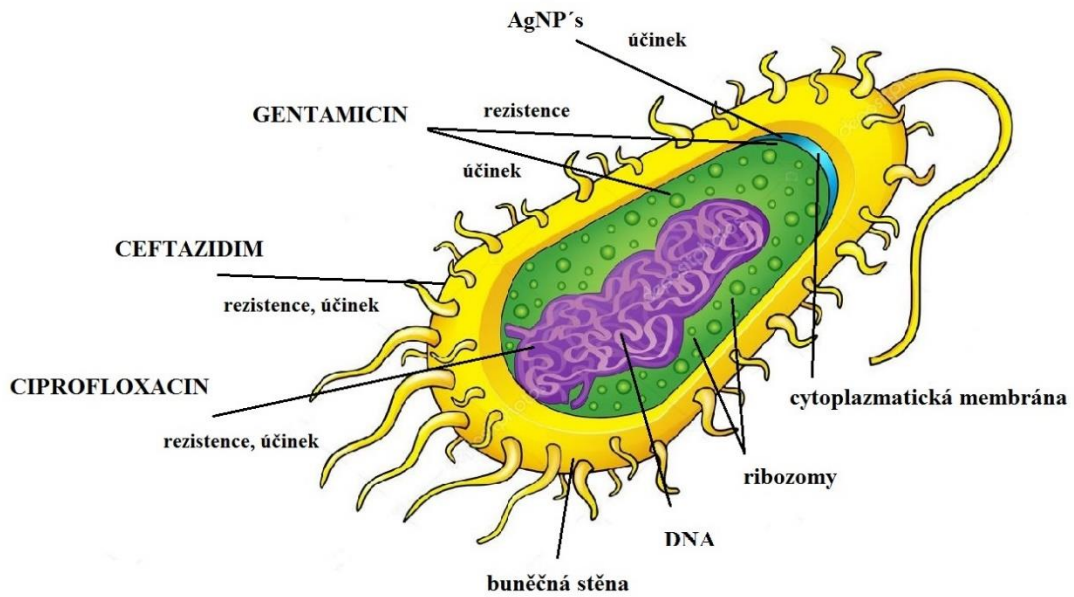
membrány či stěny. Nanočástice stříbra pravděpodobně poruší cytoplazmatickou membránu bakterie a gentamicin je schopen průniku do buňky bakterie a inhibice syntézy proteinů. Díky tomu dochází k synergickému účinku kombinace gentamicinu a nanočástic stříbra a  $\text{AgNO}_3$  a tím k obnovení citlivosti gentamicinu k testovanému bakteriálnímu kmeni.

V případě testování ceftazidimu s minimální inhibiční koncentrací 16 mg/l byla prokázána částečná synergie. Ceftazidim inhibuje tvorbu buněčné stěny připojením k ní přes beta-laktamový kruh a tím je schopen průniku do nitra bakterie. Pravděpodobně zde dochází k narušení buněčné stěny nanočásticemi stříbra či  $\text{AgNO}_3$  a uvolnění beta-laktamázy z periplazmatického prostoru mimo bakteriální buňku. V takovém případě je v periplazmatickém prostoru nedostatek tohoto enzymu pro hydrolyzu ceftazidimu, a proto antibiotikum může narušovat tvorbu buněčné stěny a pronikat do nitra bakterie. Dochází taktéž k obnovení citlivosti vůči bakterii.

Posledním testovaným antibiotikem byl ciprofloxacin, fluorochinolon, jehož minimální inhibiční koncentrace byla 32 mg/l. Podle mechanismu působení ciprofloxacinu by zde k žádné synergii docházet nemělo. Ciprofloxacin inhibuje enzymy, které jsou potřebné v replikaci DNA (gyráza a topoizomeráza IV) a tím její replikaci zamezují. Rezistence spočívá taktéž v nitru buňky vznikem chromosomálních mutací enzymu gyrázy. Výsledkem testování byl indiferentní efekt, který prokazuje danou teorii. Nanočástice stříbra či  $\text{AgNO}_3$  nejsou schopny projít přes buněčnou stěnu, tak hluboko dovnitř bakterie, kde ciprofloxacin působí. A navíc, nanočástice stříbra nejsou schopny změnit DNA gyrázu zpátky na formu, kterou ciprofloxacin dokáže inhibovat.

Dále byla zkoumána závislost velikosti testovaných nanočástic stříbra na společný antibakteriální účinek. Ze získaných výsledků není pozorována žádná závislost velikosti nanočástic stříbra, stříbrného iontu či nanočástic stříbra vázaných na nanokompozitu na výsledcích antibakteriální aktivity.





Obr. 18: Schéma bakteriální buňky s vyznačenými mechanismy účinku a rezistence antibiotik a nanočástic stříbra

### 4.3 Obnovení účinku antibiotik vůči panrezistentnímu kmeni *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je přirozeně rezistentním kmenem vůči celé řadě antibiotik a taktéž u této bakterie vzniká rychlá sekundární rezistence, a to nejčastěji po selhání terapie (nozokomiální infekce). Jedinou volbou antibiotik prozatím účinných zůstávají kolistin a amikacin. Mechanismy rezistence jsou různorodé, spočívají například v produkci metalo – beta – laktamáz, které rozkládají především karbapenemová antibiotika, dále v aktivním bakteriálním effluxu, díky němuž je antibiotikum vypuzováno z buňky, anebo také ve snížení propustnosti buněčné stěny, způsobené snížením počtu porinů a další. Díky obrovskému množství způsobů rezistence na antibiotika a také možnosti kombinace jich se pseudomonády stávají multirezistentními kmeny velice obávanými v lékařství.<sup>74</sup>

**Tabulka 2: *Pseudomonas aeruginosa* 21425/CCC/2017 – MIC testovaných vzorků a společný účinek kombinace testovaná látka – ATB (MIC GEN 4 mg/l , CTZ 8 mg/l a CIP 128 mg/l)**

	MIC [mg/l]	FIC (GEN)	Účinek	FIC (CTZ)	Účinek	FIC (CIP)	Účinek
AgNP's red. maltosou	3,375	0,574	PSYN	0,985	PSYN	1,002	IND
AgNP's red. NaBH <sub>4</sub>	1,688	0,614	PSYN	0,943	PSYN	1,006	IND
AgNO <sub>3</sub>	0,844	0,512	PSYN	0,825	PSYN	1,102	IND
GCN/AgNP's	2,860	0,630	PSYN	0,827	PSYN	1,208	IND

Výsledky antibakteriální aktivity kombinace vybraných antibiotik s nanočásticemi stříbra, dusičnanem stříbrným (AgNO<sub>3</sub>) a kyanografenem (GCN) testované proti bakterii *Pseudomonas aeruginosa* 21425/CCC/2017 uvedené výše v tabulce 2 se shodují s vyslovenou teorií.

Při testování gentamicinu, aminoglykosidického antibiotika s minimální inhibiční koncentrací 4 mg/l, byla pozorována částečná synergie. Gentamicin inhibuje syntézu proteinů v nitru buňky bakterie. Jedním z mechanismů působení nanočástic stříbra je jejich interakce s cytoplazmatickou membránou a tím způsobená smrt bakterie. Mechanismus rezistence zde tudíž musí spočívat ve změně permeability membrány či stěny. Nanočástice stříbra či AgNO<sub>3</sub> s největší pravděpodobností poruší cytoplazmatickou membránu bakterie a gentamicin je schopen průniku do buňky bakterie a inhibice syntézy proteinů. Díky tomu dochází k posílení účinku kombinace gentamicinu a nanočástic stříbra či AgNO<sub>3</sub> a tím k obnovení citlivosti gentamicinu k testovanému bakteriálnímu kmeni.

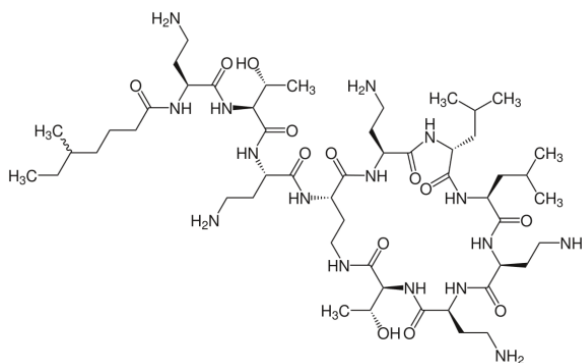
V případě testování ceftazidimu s minimální inhibiční koncentrací 8 mg/l byla prokázána taktéž částečná synergie. Ceftazidim inhibuje tvorbu buněčné stěny a tím je schopen průniku do nitra bakterie. Pravděpodobně zde dochází k narušení buněčné stěny nanočásticemi stříbra či AgNO<sub>3</sub> a uvolnění beta-laktamázy z periplazmatického prostoru mimo bakteriální buňku. V takovém případě je v periplazmatickém prostoru nedostatek enzymu pro hydrolýzu ceftazidimu, a proto antibiotikum může narušovat tvorbu buněčné stěny a pronikat do nitra bakterie. Citlivost ceftazidimu na panrezistentní bakterii je obnovena i v tomto případě.

Posledním testovaným antibiotikem byl ciprofloxacin z řádu fluorochinolonů. Minimální inhibiční koncentrace testovaného antibiotika byla 128 mg/l. Ciprofloxacin inhibuje enzymy, které jsou potřebné v replikaci DNA (gyráza a topoizomeráza IV) a tím její replikaci zamezuje. Rezistence spočívá taktéž v nitru buňky vznikem chromosomálních

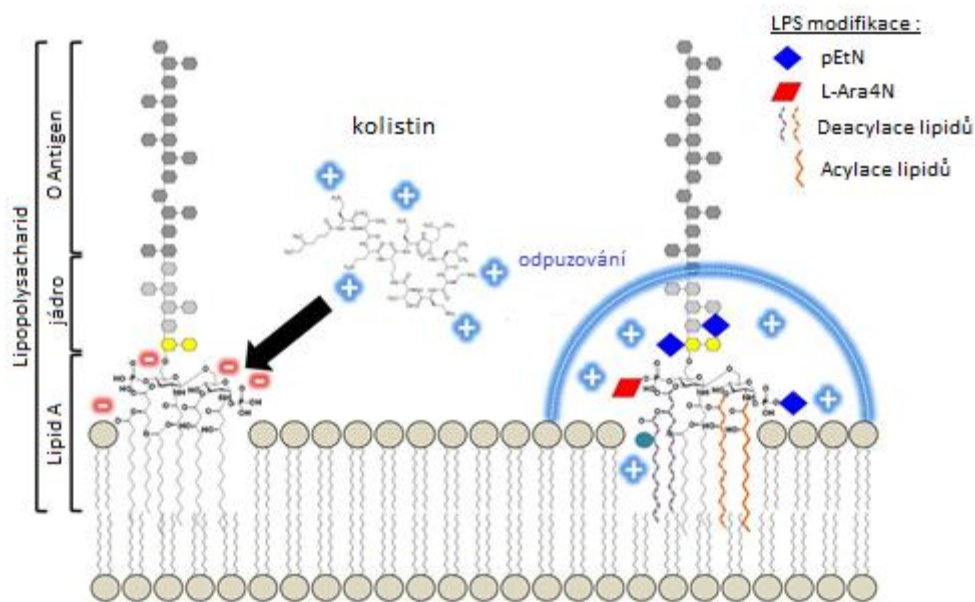
mutacích enzymu gyrázy. Nanočástice stříbra či AgNO<sub>3</sub> nejsou schopny projít přes buněčnou stěnu, tak hluboko dovnitř bakterie, kde ciprofloxacín působí. Proto zde k žádnému synergickému efektu nedochází.

#### 4.4 Obnovení účinku kolistinu a nanočástic stříbra vůči kmeni *Enterobacter kobei*

Pro antimikrobiální testování rezistentní bakterie *Enterobacter kobei* 3683/C/2018 byl použit kolistin (MIC 64 mg/l). Kolistin (tzv. Polymyxin E) patří mezi cyklická, polypeptidová antibiotika. Jedná se o antibiotikum poslední volby, nejen kvůli jeho toxicitě, ale také kvůli jeho nevyjasněnému mechanismu působení na bakterie. Kolistin je polykationický peptid obsahující hydrofilní a lipofilní funkční skupiny (obr. 19). Tyto kationtové oblasti interagují s vnější membránou bakterií tím, že v lipopolysacharidu vytěsňují ionty hořčíku a vápníku, které lipopolysacharid stabilizují. Hydrofobní / hydrofilní oblasti interagují s cytoplazmatickou membránou stejně jako detergent, solubilizují a rozrušují membránu ve vodném prostředí (Obr. 20). Místem účinku je tedy vnější buněčná membrána, buněčná stěna a cytoplazmatická membrána bakterie. Poškození cytoplazmatické membrány má za následek únik nitrobuněčných komponent. Kolistin se vyznačuje úzkým spektrem účinnosti. Vysoce účinné je zejména proti gramnegativním aerobním tyčkám. Získaná bakteriální rezistence spočívá buď v modifikaci lipidu A, v porinech, efluxní pumpě či plazmidech.



Obr. 19: Vzorec kolistinu



**Obr. 20: Mechanismus účinku kolistinu (vlevo) a mechanismus rezistence ke kolistinu (vpravo)<sup>76</sup>**

**Tabulka 3: Frakční inhibiční koncentrace kombinace testovaných vzorků s kolistinem (MIC 64 mg/l) vůči *Enterobacter kobei* 3683/C/2018**

	MIC[mg/l]	FIC	Účinek
AgNP's red. maltosou	≥108	0,202	SYN
AgNP's red. NaBH <sub>4</sub>	≥108	0,195	SYN
AgNO <sub>3</sub>	3,376	0,231	SYN
GCN/AgNP's	22,860	0,426	SYN

Výsledky antibakteriální aktivity kombinace vybraných antibiotik s nanočásticemi stříbra, dusičnanem stříbrným (AgNO<sub>3</sub>) a kyanografenem (GCN) testované proti bakterii *Enterobacter kobei* 3683/C/2018 uvedené výše v tabulce 3 vykazují silný synergický účinek ve všech testovaných kombinacích. Při testování antibakteriální aktivity kolistinu vůči dané bakterii byla hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC) 64 mg/l. Nutno podotknout, že bakterie *Enterobacter kobei* 3683/C/2018 vykazovala rezistenci nejen ke kolistinu, ale také k nanočásticím stříbra redukovaných jak maltosou, tak NaBH<sub>4</sub>, kdy hodnoty MIC nanočástic stříbra byly ≥108 mg/l. Rezistence vůči nanočásticím stříbra se projevovala agregací částic za tvorby černých sedimentů po 24 hodinové kultivaci. V případě testování dusičnanu stříbrného (AgNO<sub>3</sub>) byla hodnota MIC vyšší než v předchozích testovaných případech (3 mg/l) a taktéž i v případě kyanografenu s obsahem nanočástic stříbra (GCN/AgNP's), kdy hodnota MIC dosáhla až 22,86 mg/l.

Mechanismus rezistence ke kolistinu (obr. 20) v tomto případě spočívá v modifikaci lipopolysacharidu (LPS) navázáním molekul fosfoethanolaminu a 4-amino-4-deoxy-L-arabiny. Tím dojde ke snížení záporného povrchového náboje bakterie a tím ke snížení celkové afinity kladně nabitě molekuly kolistinu k vnější buněčné membráně bakterie.<sup>75</sup> Experimentálně to lze ověřit měřením zeta potenciálu kolistin citlivé bakterie *Enterobacter kobei*, jehož hodnota je -38 mV a kolistin rezistentní bakterie *Enterobacter Kobei* s hodnotou zeta potenciálu -11 mV. U kolistin rezistentní bakterie dochází k modifikaci LPS, snížení elektrostatické interakce a afinity kladně nabitě molekuly kolistinu k bakterii, a díky tomu je hodnota zeta potenciálu výrazně nižší.

Mechanismus překonání bakteriální rezistence ke kolistinu může pravděpodobně spočívat v navázání molekul antibiotika na povrch nanočástic stříbra prostřednictvím aminoskupin v polypeptidu. Po přidavku kolistinu (16 mg/L) k disperzi nanočástic stříbra (12,5 mg/L) v kultivačním bujónu došlo k poklesu hodnoty zeta-potenciálu nanočástic stříbra z původních -15 mV na -7 mV díky kladně nabitým molekulám kolistinu, které se pravděpodobně váží na povrch nanočástic stříbra, nicméně hodnota zeta-potenciálu nanočástic stříbra v kombinaci s kolistinem zůstává mírně záporná. Vzhledem k tomu, že hodnoty zeta-potenciálu nanočástic stříbra v kombinaci s kolistinem (-7 mV) a rezistentních bakterií ke kolistinu (-11 mV) jsou poměrně nízké, nedochází tak k jejich vzájemnému elektrostatickému odpuzování. Navíc mohou toto vzájemné odpuzování také oslabit přitažlivé síly v podobě Van der Waalových interakcí mezi nanočásticemi stříbra v kombinaci s kolistinem a bakteriemi. V konečném důsledku tak dochází k přiblížení kolistinu navázaného na nanočástice stříbra k bakterii, kde může dojít k interakci kolistinu s buněčnou stěnou, a následně i s cytoplazmatickou membránou. Vzhledem k tomu, že mechanismus účinku nanočástic stříbra spočívá taktéž v narušení buněčné stěny a membrány, je v případě kombinace nanočástic stříbra s kolistinem patrný silný synergický efekt. AgNO<sub>3</sub> a kompozit kyanografen s imobilizovanými částicemi stříbra vykazují synergický efekt s kolistinem na základě společného cílového místa působení, které se nachází na vnější buněčné membráně, buněčné stěně a vnitřní membráně.

Otázkou zůstává mechanismus rezistence bakterií k nanočásticím stříbra, které po kultivaci s rezistentním kmenem *Enterobacter kobei* agregovaly za vzniku černého sedimentu. V okamžiku kombinace nanočástic stříbra s kolistinem k agregaci nedocházelo, nanočástice byly po kultivaci s bakteriemi stabilní a nevytvářely černý sediment. Mechanismus rezistence bakterií *Enterobacter kobei* k nanočásticím stříbra bude předmětem dalšího zkoumání včetně zabránění jejich agregace v okamžiku kombinace s kolistinem.

## 5. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo studium společného antibakteriálního efektu nanočástic stříbra připravené redukcí maltosy a tetrahydridoboritanu sodného, dusičnanu stříbrného a kyanografenu s imobilizovanými nanočásticemi stříbra v kombinaci s vybranými antibiotiky testované vůči rezistentním bakteriím. Z rezistentních bakteriálních kmenů byly vybrány *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter kobei* a k nim odpovídající antibiotika.

Výsledky antibakteriální aktivity kombinace vybraných antibiotik a nanočástic stříbra,  $\text{AgNO}_3$  a kyanografenu s imobilizovanými nanočásticemi stříbra vůči rezistentnímu kmeni *Escherichia coli* CE ESBL 5556 prokázaly závislost na mechanismu účinku antibiotika na bakterii a mechanismu rezistence bakterie vůči antibiotiku. Synergický účinek byl prokázán v případě antibiotika gentamicin, vůči němuž testovaná bakterie vykazovala rezistenci spočívající ve změně permeability membrány. U ceftazidimu byla prokázána částečná synergie, kdy při působení antibiotika dochází k inhibici buněčné stěny a při rezistenci je antibiotikum hydrolyzováno enzymy produkujícími bakterií. Naopak u ciprofloxacinu, jehož mechanismu účinku spočívá v inhibici enzymů potřebné pro replikaci DNA a rezistence spočívá v mutaci těchto enzymů, nedošlo ke společnému synergickému účinku testované kombinace. V případě testování panrezistentní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* 21425/CCC/2017 byly získány podobné výsledky.

V případě testování antimikrobiální aktivity vůči rezistentní bakterii *Enterobacter kobei* 3683/C/2018 byl použit kolistin. Výsledky testování společného účinku kolistinu v kombinaci s testovanými látkami na bázi stříbra vykazují silný synergický účinek. Obnovení účinku kolistinu v kombinaci s nanočásticemi stříbra zřejmě souvisí s elektrostatickými interakcemi mezi nanočásticemi modifikovanými kolistinem a testovanou bakterií.

Dále byla zkoumána závislost velikosti testovaných nanočástic stříbra na společný antibakteriální účinek. Ze získaných výsledků není pozorována žádná velikostní závislost nanočástic stříbra, stříbrného iontu či nanočástic stříbra vázaných na nanokompozit na výsledcích antibakteriální aktivity.

## 6. Summary

The aim of my diploma thesis was study of common antibacterial effect of silver nanoparticles reduced by maltose and NaBH<sub>4</sub>, AgNO<sub>3</sub> and cyanographene with immobilized silver nanoparticles (G\_CN/AgNP's) in combination with chosen antibiotics. It was tested against resistant bacteria. From resistant bacterial strains were chosen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cobei* and corresponding antibiotics.

Results of antibacterial activity of combination of chosen antibiotics and silver nanoparticles, AgNO<sub>3</sub> and cyanographene with immobilized silver nanoparticles against resistant strain *Escherichia coli* CE ESBL 5556, shown depending on effect of antibiotics on bacteria and mechanism of bacterial resistance against antibiotic. Synergistic effect has been proven in gentamicin with resistant mechanism lies in changing in membrane permeability. Ceftazidim was proved partial synergy when applying antibiotic causes inhibition of the cell wall. During resistance, ceftazidim is hydrolysed by enzyme which are produced by bacteria. In case of ciprofloxacin, whose mechanism of action lies in inhibition of enzyme needed for DNA replication and mechanism of resistance lies in mutation in these enzyme, there wasn't common synergistic effect of the testing combination. In case of testing panresistant bacteria *Pseudomonas aeruginosa* 21425/CCC/2017, comparable results were obtained.

For antibacterial testing of resistant bacteria *Enterobacter kobei* 3683/C/2018 were used colistin. Results testing of common effect of colistin in combination with silver-based tested substances were shown strong synergistic effect. The recovery effect of colistin in combination with silver nanoparticles seems to be related to electrostatic interactions between colistin-modified nanoparticles and the tested bacterium.

In the next part the size dependence on silver nanoparticles were tested. There is no size dependency on silver nanoparticles, silver ion or silver bonded on nanokompozit on antibacterial activity, obtained from results.

## 7. Reference

1. Panáček A, Kvítek L. *Základy Koloidní Chemie*. 1st ed. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007.
2. Pouchlý, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1998.
3. Bartovská L, Šiškovská M. *Fyzikální Chemie Povrchů a Koloidních Soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko – technologická, 2012.
4. Vojuckij SS. *Kurs Koloidní Chemie*. 1st ed. SNTL Praha, 1984.
5. Dědková, K. *Studium antibakteriální a antivirotické aktivity nanočástic stříbra*. Olomouc, 2011. Diplomová práce. UPOL.
6. Panáček, A., Kvítek, L., Klečková, M. Koloidní chemie v praktických úlohách. *Chem. Listy* 98, 2004, 39-41.
7. Kvítek, L. *Metody studia koloidních soustav*. Katedra fyzikální chemie PřF Olomouc, 2006 (Prozatímní učební text). [cit. 2019-01-6] Dostupné z <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
8. *Silver Nanoparticles* [online]. [cit. 2019-01-6]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>
9. Komers, K. *Základy koloidní chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1996.
10. Ščukin, ED., Percov AV., Amelinová EA. *Koloidní chemie*. 1.st ed. Praha: Academia, 1990.
11. Cosgrove, T. *Colloid Science – Principles, Methods and Applications*. 2nd edition. Wiley, 2010.
12. Novák, J. et al. *Fyzikální Chemie – Bakalářský a Magisterský Kurz*. 1st ed. Praha: Vysoká škola chemicko – technologická, 2008.
13. Shi, J. *Steric Stabilization*. Columbus: Ohio State University, 2002.
14. Pashley, RM., Karaman, ME. *Applied colloid and surface chemistry*. West Sussex: Wiley, 2004.
15. Fritz G, Schädler V, Willenbacher N, Wagner NJ. *Electrosteric stabilization of colloidal dispersions*. *Langmuir*. 2002, **18**(16), 6381-6390.
16. *Isoelectric points of nanomaterials* [online]. [cit. 2019-01-22]. Dostupné z: <https://www.materials-talks.com/blog/2017/07/27/isoelectric-points-of-nanomaterials-qa>
17. Everett DH. et al., *Basic Principles of Colloid Science*. Royal Society of Chemistry London, 1992.
18. Shaw, DJ. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2003.



19. Suchomel, P., Prucek, R., Panáček, A., and Kvítek, L. Two – Step Preparation of Silver Nanoparticles. *J. Sci. Conf. Proc.* 2011, vol. 3, 1–4.
20. Kvítek, L. *Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra*. Olomouc, 2008. Habilitační práce. UPOL.
21. Abou El-Nour, KMM., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., Ammar, RAA. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab J Chem.* 2010, **3**(3), 135-140.
22. Kvítek, L., Prucek, R., Panáček, A., Soukupová, J. *Nanočástice stříbra – příprava, vlastnosti a aplikace. NANOCON, Rožnov pod Radhoštěm 2009*, 1–9
23. Lee, PC. and Meise, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* 1982, **86**, 3391-3395.
24. Panáček, A. et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J Phys Chem B.* 2006, **110**, 16248-16253.
25. Sharma, VK., Yngard, RA., Lin, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009, **145**(1-2), 83-96.
26. Panáček, A. et al. Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules.* 2015, **21**(1), 1-17.
27. Ševčíková, P., et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chem. Listy* 108, 2014, 479-482.
28. *Transmisní elektronová mikroskopie* [online]. [cit. 2019-01-26]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>
29. Prucek, R., et al. Silver colloids - methods of preparation and utilization. *Chemica.* 2004, **34**.
30. Panáček, A. *Příprava a studium biologických vlastností nanočástic stříbra*. Olomouc, 2013. Habilitační práce. UPOL.
31. Gurunathan, S. Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. *J Ind End Chem* 29, 2015, 217–226.
32. Morones, JR. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology.** 2005, **16**, 2346–2353.
33. Pal, S., Tak, YK., Song, JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb*, 2007, **73**(6), 1712-1720.
34. Smékalová, M. et al. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *The veterinary journal.* 2016, **209**, 174-179.
35. Botelho, MG. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J Dent.* 2000, **28**, 565–570.

36. Panáček, A. *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids Surf B*, 2016, **142**, 392-399.
37. Graves, JL., Tajkarimi, M., Cunningham, Q. *et al.* Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in Escherichia coli. *Front Genet.* 2015, **6**(42).
38. Panáček, A. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. *Biomaterials.* 2009, **30**, 6333-6340.
39. Elechiguerra, JL, Burt, JL, Morones, JR, *et al.* Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2005, **3**(6).
40. Lu, L, Sun, RW-Y., Chen, R. *et al.* Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther.* 2008, **13**(2), 253-262.
41. Kim, YS. *et al.* Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology.* 2010, **7**.
42. Kolář, M. *et al.* The development of bacterial resistance and new antimicrobial agents, *Int J Antimicrob Agents.* 2001, **17**, 357-363.
43. Votava M. *Lékařská mikrobiologie obecná.* Brno-Jundrov: Neptun, 2005, 231-273.
44. Čechová, L., Janalíková, M. *Obecná mikrobiologie*, 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, 2007.
45. Simon, C., a Stille, W. *Antibiotika v současné lékařské praxi.* Havlíčkův Brod: Grada Publishing, 1998.
46. Tipper, DJ. Mode of action of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther.* 1985, **27**, 1-35.
47. Poole, K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2004, **61**(17), 2200-2223
48. Garneau-Tsodikova, S., Labby, KJ. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med Chem Commun.* 2016, **7**(1), 11-27.
49. Evans, ME., Feola DJ., Rapp, RP. Polymyxin B Sulfate and Colistin: Old Antibiotics for Emerging Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *Annals of Pharmacotherapy.* 1999, **33**, 960-967.
50. Hooper, DC., Wolfson, JS., Ng, EY., Swartz, MN. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *Am J Med.* 1987, **82**(4 A), 12-20.
51. 123 RF [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: [https://www.123rf.com/photo\\_53248094\\_stock-vector-antimicrobial-resistance-or-antibiotic-resistance-.html](https://www.123rf.com/photo_53248094_stock-vector-antimicrobial-resistance-or-antibiotic-resistance-.html)
52. Smékalová, M. *Biologická aktivita nanočástic stříbra vůči eukaryotním a prokaryotním organismům.* Olomouc, 2018. Disertační práce. UPOL.
53. de Vicente, A., Avilés, M., Codina, JC., Borrego, JJ., Romero, P. Resistance to antibiotics and heavy metals of Pseudomonas aeruginosa isolated from natural waters. *J App. Bacteriol.* 1990, **68**, 625–632.

54. Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*. 2017, 1-7.
55. Navarro, E., Baun, A., Behra, R. Environmental behaviour and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*. 2008, **17**, 372–386
56. Kim, J.S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007, **3**, 95–101.
57. Sondi, I., Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*. 2004, **275**, 177–182.
58. Seil, J., Webster, T. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *Int J Nanomedicine*. 2012, **7**, 2767-2781.
59. Jung, W. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and E. coli. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**, 2171-2178.
60. Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A., Esmaili, MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. *Microbiol Res J Int*, 2011, **162**, 542-549.
61. Durante-Mangoni, E. a kol. Do we still need the aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents*. 2009, **33**, 201-205.
62. Purgertová, M. *Mechanismy resistance bakterií vůči aminoglykosidům, jejich genetický základ a metody detekce*. Brno, 2010. Bakalářská práce. MUNI.
63. *Pharma Wiki* [online]. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Ceftazidim>
64. Marešová, L. *Vývoj antibiotické rezistence na vybrané bakteriální druhy v komunitě a v nemocnici ve spádové oblasti oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek a.s. v letech 2000 - 2010*. České Budějovice, 2012. Bakalářská práce. JU.
65. Valenta, T. *Antibiotická rezistence kmenů Escherichia coli a její význam v potravním řetězci*. Zlín, 2011. Diplomová práce. UTB.
66. Dalecká, M. *Mechanismus rezistence mikroorganismů na antibiotika*. Pardubice, 2012. Bakalářská práce. UPA.
67. Klvaňa, M. *Bakteriální rezistence ke kolistinu: mechanismy, epidemiologie a klinický význam*. Brno, 2018. Bakalářská práce. MUNI.
68. Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*. 2017, **30**, 557–596.
69. Cajal, Y., Rogers, J., Berg, O.G., Jain, M.K. Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. *Biochemistry*, 1996, **35**, 299–308.
70. *Nano-particle size / zeta potential analyzer facility of bu advanced technologies r & d center* [online]. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <http://www.arage.boun.edu.tr/psa.html>

71. *Laboratory for Characterization and processing of polymers* [online]. [cit. 2019-04-26].  
Dostupné z: <http://lcpp.fs.um.si/equipment/page/3/>
72. *Scientific and Medical Products* [online]. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z:  
<http://www.scimed.co.uk/product/specord-s600/>
73. Panáček, D. *Covalently functionalized graphene derivatives for immobilization of Ag nanoparticles as antibacterial nanohybrids*. Olomouc, 2018. Diplomová práce. UPOL.
74. Lambert, PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.* 2002, **29** (41), 22-26.
75. Rachel, L. Soon et al., Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J Antimicrob Chemother.* 2011, **66**, 126-133.
76. Dortet, L., Bonnin, R., Jousset, A., Gauthier, L., Naas, T. The emergence and spread of plasmid-mediated resistance to colistin in Enterobacteriaceae: Compromising the last bastion on the way to pan-drug resistance! *J Anti Infect.* 2016, **18** (4), 139-159.

## 8. Seznam zkratek

AgNP's	nanočástice stříbra
CIP	ciprofloxacin
COL	kolistin
CTZ	ceftazidim
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESBL	širokospektré beta laktamázy
FIC	frakční inhibiční koncentrace
GCN	kyanografen
GEN	gentamicin
LPS	lipopolysacharid
MCR-1	gen rezistentní vůči kolistinu
MH	Müeller-Hintonův bujon
MIC	minimální inhibiční koncentrace
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
UV-Vis	ultrafialová viditelná oblast